

Aus dem Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die antibakterielle Wirksamkeit kalter atmosphärischer
Plasmen in Knochen. Eine *In-vitro*-Studie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Wei-Long Dennis Chen

aus Berlin.

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Abstract.....	5
Einleitung	8
1 Anwendungsmöglichkeiten und Funktionsmechanismen von Plasma.....	9
1.1 Plasma-Jet.....	10
1.2 DBD-Plasma	12
1.3 Einführung in die Plasmamedizin.....	13
1.3.1 Wirkungsweise von CAP auf Mikroorganismen	14
1.3.2 Wirkungsweise von Plasmen auf Tumorzellen	17
1.3.3 Einfluss von Plasmen auf wundheilungsfördernde Zellen	18
1.4 Überblick über die Wirkungsweise von Plasmen	19
2 Zielstellung (Problemstellung).....	20
3 Material und Methodik.....	21
3.1 Kultivierung der Bakterien.....	21
3.2 Herstellung der Knochenproben	22
3.2.1 Porcine Knochenproben	22
3.2.2 Humane Knochenproben.....	25
3.3 Behandlung der Proben.....	26
3.3.1 Inkubationsphase (Probenvorbereitung).....	26
3.3.2 Applikationsphase	27
3.4 Datenerhebung und -verarbeitung	33
3.5 Statistische Analyse.....	33
3.6 Mikro-Computertomographie	33

4	Ergebnisse.....	34
4.1	CFU-Counts.....	34
4.1.1	Porcine Knochenproben	34
4.1.2	Humane Knochenproben.....	38
4.2	Mikro-Computertomographie	41
5	Diskussion	43
6	Zusammenfassung	55
7	Literaturverzeichnis.....	57
8	Eidesstattliche Versicherung.....	68
9	Lebenslauf	69
10	Danksagung.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>kINPen MED (neoplas tools, Greifswald, Deutschland)</i>	11
Abbildung 2: Beispielhafte Behandlung einer humanen Knochenprobe mit dem kINPen MED	12
Abbildung 3: PlasmaDerm 20MM (CINOGY GmbH, Duderstadt, Deutschland)	13
Abbildung 4: Versuchsdesign.....	21
Abbildung 5: Gewinnung der zylinderförmigen Schweineknochen.....	24
Abbildung 6: Aufbau des Technovitmodells sowie die Anordnung der Slots zur Aufnahme von drei übereinander geschichteten Knochenzylindern (P1; P2; P3).....	28
Abbildung 7: Labortisch zur Präzisionsapplikation gemäß Abbildung 8	31
Abbildung 8: <i>Schema zur dynamischen Applikation von CAPI auf der Probenoberfläche</i>	32
Abbildung 9: CFU-Outcome der porcinen Proben in der ersten Schicht P1: 0 - 3000 µm	35
Abbildung 10: CFU-Outcome aller Gruppen der porcinen Proben in der zweiten Schicht P2: 3000 – 6000 µm.....	36
Abbildung 11: CFU-Outcome aller Gruppen der porcinen Proben in der dritten Schicht P3: 6000 – 9000 µm.....	37
Abbildung 12: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der ersten Schicht H1: 0 - 3000 µm.....	38
Abbildung 13: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der zweiten Schicht H2: 3000 – 6000 µm	39

Abbildung 14: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der dritten Schicht H3: 6000 - 9000 μm	40
Abbildung 15 Human Knochenprobe	41
Abbildung 16 Porcine Knochenprobe.....	41

Abkürzungsverzeichnis

Ar	Argon
ASK- 1	apoptosis signal regulating kinase 1
BHI	brain heart infusion
BRONJ	bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw
CAP	cold atmospheric plasma
CFU	colony forming unit
CHX	Chlorhexidin
DBD	dielectric barrier discharge
DBE	Dielektrisch behinderte Entladungen
DNA	deoxyribonucleic acid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	<i>Escherichia Coli</i>
FGF	fibroblast growth factor
f	Frequenz
H	Wasserstoff
HaCaT	human adult low calcium temperature
He	Helium
IL	Interleukin
J	Joule
JNK	c-Jun N-terminal kinase
log RF	Logarithmischer Reduktionsfaktor
MRONJ	medication-related osteonecrosis of the jaw
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
O	Sauerstoff
O₂⁻	Superoxid-Anion
O₃	Ozon
OH	Hydroxylion
P. aeruginosa	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
PDT	Photodynamische Therapie
RNA	ribonucleic acid

rpm	rounds per minute
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
S. mitis	<i>Streptococcus mitis</i>
SiC	Siliziumkarbid
Slm	standard liters per minute
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TGF	transforming growth factor
U	Spannung
UV	Ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor

Abstract

Background: Despite strong efforts to combat infections, conventional treatments are sometimes insufficient due to the rising problem of microbial resistance. In case of medication-related osteonecrosis of the jaw microbial contamination and biofilm formation are part of the pathological mechanism. As cold atmospheric plasma (CAP) has antimicrobial effects even against multiresistant germs and promotes wound healing mechanisms, it appears to be a promising addition to traditional therapies in order to face the impediments mentioned above. Thus, the purpose of the present study was to investigate the antibacterial efficacy of CAP against bacterial biofilms in porcine and humane bone.

Methods: First out of each, 120 porcine and 120 human cancellous bone cylinders, groups of three samples were randomly formed and arranged to vertical triplets. Secondly, the specimens were embedded into resin blocks, and incubated with *S. mitis* biofilms. Subsequently, the upside of the superficial sample was exposed to either CAP emitted by a plasma jet (CAPI) or a dielectric barrier discharge device (CAPII), photodynamic laser therapy (PDT), chlorhexidine mouthwash (CHX) or saline solution as negative control (C). After planctonizing the bacteria the numbers of colony-forming units (CFU) were counted. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney-U-test.

Results: After treatment with CAPI the median logCFU/ml in the superficial (0 – 3000 µm) and the deepest specimens (6000 – 9000 µm) of porcine and human bone samples were significantly lower than in the control group (CAPI vs C; layer I: $p_{\text{porcine}} = 0.001$; $p_{\text{human}} = 0.007$; layer III: $p_{\text{porcine}} = 0.002$; $p_{\text{human}} = 0.038$ [Mann-Whitney-U-test]). Furthermore, the CFU-counts were significantly lower after using CAPI compared to CAPII and PDT in layer I (CAPI vs CAPII; layer I: $p_{\text{porcine}} = 0.001$; vs PDT; layer I: $p_{\text{porcine}} = 0.001$; $p_{\text{human}} = 0.002$). In layer II of the porcine bone (3000 – 6000 µm) CAPI resulted in significantly lower numbers of *S. mitis* compared to CAPII (CAPI vs CAPII; layer II: $p_{\text{porcine}} = 0.002$;). The utilization of CAPII resulted in no significant reduction of the median logCFU/ml in the porcine or the human bone in any layer compared to PDT, CHX or C ($p > 0.05$).

Conclusion: CAP appears to be promising in order to contribute to the antibacterial therapy of infected bone, even though the antimicrobial efficacy seems to vary between different plasma sources. The clinical impact of the obtained results needs to be assessed in further studies.

Hintergrund: Bei der Behandlung mikrobieller Infektionen durch lokale Antiseptika und systemische antimikrobielle Therapeutika stellen insbesondere multiresistente Keime ein zunehmendes Problem dar. Für die Pathogenese medikamentenassoziierter Osteonekrosen des Kiefers spielen pathogene Mikroorganismen bzw. mikrobielle Biofilme eine wesentliche Rolle. Kaltes atmosphärisches Plasma (CAP) bietet in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ansatz, da es auch gegen entsprechende Pathogene wirksam ist und zudem das Potenzial hat, Regenerationsmechanismen im behandelten Gewebe zu stimulieren. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die antibakterielle Wirksamkeit zwei verschiedener Plasmaquellen, einem Plasma-Jet und einer DBD-Quelle, in mit bakteriellen Biofilmen kontaminiertem spongiösem porcinem und humanem Knochen zu untersuchen.

Methodik: Jeweils 120 porcine und humane spongiöse Knochenzylinder wurden mit *S. mitis*-Biofilmen beschickt. Hierbei wurden je drei randomisiert selektierte Knochenproben in einem Technovitblock vertikal übereinander positioniert, sodass nur die Oberflächen der obersten Proben exponiert blieben. Die Proben wurden daraufhin mit einem Plasma-Jet (CAPI), Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII), Chlorhexidin (CHX), photodynamischer Lasertherapie (PDT) oder Natriumchloridlösung als Negativkontrolle (C) behandelt. Anschließend erfolgte die Planktonisation der Bakterien und die Ermittlung der Zahl koloniebildender Einheiten (CFU). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Ergebnisse: Nach der Anwendung von CAPI zeigte sich eine signifikante Reduktion der medianen logCFU/ml in der ersten Schicht I (0 – 3000 µm) bei den porcinen und humanen Proben im Vergleich zur Negativkontrolle (CAPI vs C; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$; $p_{\text{human}} = 0,007$ [Mann-Whitney-U-Test]). Außerdem bewirkte CAPI in der ersten Schicht signifikant reduzierte CFU-Zahlen sowohl im Vergleich zu DBD-Plasma als auch PDT (CAPI vs CAPII; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$; vs PDT; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$; $p_{\text{human}} = 0,002$). In Schicht II des porcinen Knochens resultierte die Applikation von CAPI gegenüber CAPII in signifikant kleineren CFU-Zahlen von *S. mitis* (CAPI vs CAPII; Schicht II: $p_{\text{porcin}} = 0,002$). Im porcinen und humanen Knochen in Schicht III (6000 - 9000 µm) war zudem eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen durch CAPI verglichen mit der Negativkontrolle nachweisbar (CAPI vs C; Schicht III: $p_{\text{porcin}} = 0,002$; $p_{\text{human}} = 0,038$). CAPII bewirkte in keiner Schichttiefe eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen in Relation zu PDT, CHX oder C ($p > 0,05$).

Zusammenfassung: Eine adjuvante Applikation von CAP zur Behandlung von infiziertem Knochen erscheint zunächst vielversprechend. Allerdings deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie an, dass die antibakterielle Wirksamkeit von der Art der untersuchten Plasmaquelle abhängig ist, sodass sich hieraus Ansätze für weiterführende Untersuchungen ergeben.

Einleitung

Bei mikrobiellen Infektionen des Knochens finden sowohl systemisch und lokal applizierte antimikrobielle Wirkstoffe sowie lokale Antiseptika Anwendung. Probleme ergeben sich jedoch aus der Entwicklung von Resistenzen gegenüber den genannten Agenzien. Hieraus wiederum ergibt sich ein Bedarf nach alternativen Therapien, insbesondere solchen, die in ihrer Wirksamkeit nicht durch die klassischen Mechanismen der mikrobiellen Resistenz beeinträchtigt werden (1-3). Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Anwendung von kaltem atmosphärischem Plasma (CAP). Es kann artifiziell erzeugt werden und zeigt eine antimikrobielle Wirkung, die multiresistente Keime einschließt (4, 5).

Die Pathomechanismen medikamentenassoziierter, vor allem bisphosphonatassoziierter Osteonekrosen des Kiefers (bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw, BRONJ und medication-related osteonecrosis of the jaw, MRONJ) oder infektiöser Osteomyelitiden sind zuletzt mit mikrobiellen Biofilmen und insbesondere pathogenen Bakterien in Verbindung gebracht worden (6, 7). So spielt z. B. die bakterielle Kolonisation mit *Actinomyces spp.* und deren Akkumulation auf der zur Mundhöhle exponierten Knochenoberfläche eine pathophysiologische Rolle bei der multifaktoriell bedingten MRONJ (6, 8-11). Hierbei stellen eine unzureichende Mundhygiene sowie invasive dentalchirurgische Eingriffe Risikofaktoren für die mikrobielle Kontamination des Knochens dar (12-14). Allerdings treten Kieferosteonekrosen auch unabhängig von den hier aufgeführten Risikofaktoren auf (15).

Eine zuvor durchgeführte *In-vitro*-Studie zur Untersuchung der adjuvanten Nutzung von CAP auf infiziertem kortiko-spongiösem mandibulären porcinen Knochen lieferte den Ansatz, die Wirksamkeit von CAP auf spongiösen porcinen und humanen Knochen weiterführend zu untersuchen (16).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit verschiedener Plasmaquellen in mit *S. mitis*-Biofilmen infiziertem porcinen und humanen Knochen *in-vitro*. Es wurde vermutet, dass durch die Applikation von Plasma die bakterielle Belastung und hiermit die Zahl der koloniebildenden Einheiten (colony-forming units, CFU) im Vergleich zu Chlorhexidin (CHX), der photodynamischen Lasertherapie (PDT) und einer Negativkontrollbehandlung signifikant reduziert wird. Zudem sollte untersucht werden, inwiefern sich die angenommenen Effekte in unterschiedlichen Tiefen von spongiösem Knochen zeigen.

1 Anwendungsmöglichkeiten und Funktionsmechanismen von Plasma

Physikalisches Plasma ist neben fest, flüssig und gasförmig als vierter Aggregatzustand klassifiziert und ein partiell oder vollständig ionisiertes Gas. Plasma ist daher in seiner Zusammensetzung ein variabler Komplex aus Elektronen sowie neutralen und ionisierten Atomen und Molekülen. Begleitend findet man elektromagnetische Felder, sichtbares Licht, UV- und Wärmestrahlung. Zudem werden durch Plasma reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) induziert. Plasmen werden entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften, d. h. nach ihrer Temperatur, der Art der emittierten Strahlung und den Eigenschaften der induzierten elektrischen Felder klassifiziert (17). In der Natur kommt Plasma in der Sonne oder in Form von Blitzen vor. Neben vielfältigen technischen Anwendungsmöglichkeiten künstlich erzeugter Plasmen hat sich zusammenfassend für die medizinische Nutzung der Begriff der Plasmamedizin herausgebildet. Thermisches bzw. heißes Plasma, das als Gas nahezu oder vollständig ionisiert ist, weist Temperaturen ab 40 bis hin zu mehreren Tausend Grad Celsius auf. Die Nutzung von heißen Plasmen in der Medizintechnik ist bereits seit mehreren Jahren etabliert. Sie werden beispielsweise bei der Sterilisation von Instrumenten, der Oberflächenbearbeitung von Biomaterialien oder beim Löten und Schweißen verwendet (18). Zusätzlich finden sie zur Koagulation, Ablation und Kauterisation Anwendung (19). Kaltes Plasma ist hingegen nur geringfügig, d. h. bis zu einem Maximum von 0,1 %, ionisiert. Dementsprechend liegt die Temperatur dieser Plasmen unterhalb von 40 °C. Diese Eigenschaft ermöglicht daher innerhalb gewisser Dosisgrenzen eine sichere Anwendung auf menschlichem Gewebe (20). Als Trägergase dienen z. B. Argon (Ar), Helium (He) oder Umgebungsluft. Generell hängt die physikalische und biologische Wirkung eines Plasmas von der Zusammensetzung des zugeführten Gases bzw. Gasgemisches, der Applikationsdauer und den chemischen Reaktionen auf der bestrahlten Oberfläche ab. Plasmaquellen lassen sich aus technischer Sicht bzw. in Abhängigkeit vom Modus der Erzeugung von Plasma in zwei Gruppen unterteilen: die indirekten und die direkten Plasmaquellen (21).

1.1 Plasma-Jet

Der kINPen MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) ist den indirekten Plasmaquellen zuzuordnen und funktioniert als sogenannter Plasma-Jet. Er ist für die klinische Anwendung sowohl in der Tiermedizin als auch in der Humanmedizin zugelassen. Aus einer Druckgasflasche wird das Trägergas Argon in die Steuereinheit und weiter bis hin zum Handstück eingespeist, wo das Plasma mit Hilfe einer stabförmigen Hochfrequenzelektrode im Gasstrom generiert wird. Durch einen standardisierten Gasdurchfluss wird es kontinuierlich durch eine Kapillare an der Spitze des Handstückes als sogenanntes Effluent ausgeleitet. Nach Austritt vermischt es sich mit der Umgebungsluft. Der Gasfluss wird hierbei primär über ein Druckventil an der Gasflasche und sekundär über eine zusätzliche Feinregelung an der Steuereinheit des kINPen MED eingestellt (Abbildung 1). Die Menge an durchströmendem Gas unterscheidet sich bei verschiedenen Plasmageräten. Im Falle des kINPen wird der Gasfluss auf 5 slm (Standard-Liter pro Minute) eingestellt. Um die Voraussetzungen zur Erzeugung eines atmosphärischen Kaltplasmas mit einer Energie von unter $60 \text{ J/cm}^2 \cdot \text{min}$ erfüllen zu können, wird das Trägergas mit einem hochfrequenten Wechselstrom ($U = 2 - 6 \text{ kV}$, $f = 1,1 \text{ MHz}$) ionisiert. Somit wird kontinuierlich CAP emittiert, von dem ein blauer Lichtkegel sichtbar ist (Abbildung 2). Der kINPen MED ist aufgrund seiner Konstruktion auch für kompromittiert zugängliche Bereiche geeignet, wie sie in der Zahnmedizin häufig vorkommen. Beispielsweise wurde er in *In-vitro/Ex-vivo*-Studien zur Behandlung von Wurzelkanälen, infiziertem Wurzeldentin und Wurzelkaries verwendet (22, 23). Bei der Anwendung des kINPen wird eine Applikationszeit von 30 - 60 s/cm² empfohlen. Wundgebiete, deren Größe die Applikationsfläche von 1 cm² des vom kINPen MED erzeugtem Plasma überschreiten, können durch ein schrittweises Abrastern behandelt werden. Indirekte Quellen unterscheiden sich von direkten Quellen insofern, als dass das Plasma unabhängig vom Zielmedium generiert werden kann. Sie benötigen daher keinen Gegenpol, der als Gegenelektrode fungiert.



Abbildung 1: *kINPen MED (neoplas tools, Greifswald, Deutschland)*

1: Druckventil an der Argonflasche zur Grobregulation des Gasstroms 2: Handstück zur Applikation 3: Steuereinheit mit Feinregulation des Argon-Gasflusses



Abbildung 2: Beispielhafte Behandlung einer humanen Knochenprobe mit dem kINPen MED
Zu sehen ist das Effluent und eine Adaptation des blauen Lichtkegels an die irreguläre Knochenoberfläche.

1.2 DBD-Plasma

Das PlasmaDerm-Gerät 20MM (CINOGY GmbH, Duderstadt, Deutschland) basiert auf dem Prinzip des „dielectric barrier discharge“ (DBD; dielektrisch behinderte Entladungen [DBE]) und ist den direkten Plasmaquellen zuzuordnen. Grundsätzlich werden hierbei für die Erzeugung von CAP zwei durch ein isolierendes Dielektrikum getrennte Elektroden benötigt. Bei DBD-Quellen beinhaltet das Endstück der Plasmaquelle eine Hochspannungselektrode, welche mit einem isolierenden Dielektrikum überzogen ist. Die zu behandelnde Oberfläche (z. B. Haut) fungiert dann als Gegenelektrode. Ein Abstandshalter am Ende des Handstückes gewährleistet einen ausreichend dimensionierten Raum zwischen den beiden Elektroden, in dem sich Umgebungsluft befindet. Durch die Aktivierung der Hochspannungselektrode wird die Umgebungsluft ionisiert. Die Kontrolleinheit des PlasmaDerm (Abbildung 3) ermöglicht eine Steuerung der Dosis durch eine Anpassung der Applikationszeit. Es wird eine Anwendungszeit von 90 Sekunden pro von der Elektrode abgedeckter Oberfläche empfohlen. Das in der

vorliegenden Studie verwendete Handstück eignet sich für die Applikation auf ebenen Flächen.



Abbildung 3: PlasmaDerm 20MM (CINOGY GmbH, Duderstadt, Deutschland)

1: Kontrolleinheit mit Display 2: Handstück mit aufgesetztem Abstandshalter

1.3 Einführung in die Plasmamedizin

Kaltes atmosphärisches Plasma stellt eine innovative und vielversprechende Therapiemöglichkeit zur Behandlung mikrobieller Infektionen und zur Unterstützung von Regenerationsmechanismen dar. Die Zusammensetzung von Plasmen und die biologische Wirkung ihrer Bestandteile auf Mikroorganismen einerseits und auf Gewebe und dessen Zellen andererseits hängt von der Art der Plasmaquelle und der applizierten Dosis ab. Die synergistische Kombination der durch CAP induzierten Wirkkomponenten besitzt die Fähigkeit auch multiresistente Keime zu inhibieren (4, 5, 24) und zeitgleich zelluläre Mechanismen zu beeinflussen. Zu diesen zählen u. a. stimulatorische Effekte auf Regenerationsprozesse als Teile der Wundheilung (17, 25-27) und auch eine

selektive Induktion der Apoptose von Tumorzellen, beispielsweise bei Zellen mit Mutation des Tumorsuppressors p53 (28). Unter anderem basieren diese Effekte auf der Freisetzung von verschiedenen reaktiven Spezies und UV-Strahlung. Eine Schlüsselrolle spielt v. a. die Induktion der reaktiven Sauerstoff- (reactive oxygen species, ROS) und Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) (17, 21, 29). Bei CAP nachgewiesene reaktive Spezies sind u. a. Ozon (O_3) (30), Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$) (31), Singulett-Sauerstoff (1O_2), atomarer Sauerstoff (O) (32), Superoxid-Anion (O_2^-) (33) und Stickstoffmonoxid (NO) (34). Die Applikation von CAP beeinflusst folglich durch eine Freisetzung von ROS und RNS die Physiologie von Zellen, wie z. B. Tumorzellen, in denen p53 mutiert ist, oder HaCaT-Keratinocyten (HaCaT; adult low calcium temperature), sowohl durch extrazellulären als auch intrazellulären oxidativen und nitrosativen Stress (28, 35).

Für die klinische Anwendung am Menschen wurden innerhalb der therapeutischen Breite bisher, bis auf Wärmesensation und temporäre Rötungen der Haut, keine relevanten unerwünschten Wirkungen beschrieben (36). Die durch CAP emittierte UV-Strahlung liegt nach aktuellem Kenntnisstand bei Limitation der Dosis unterhalb der humanes Gewebe schädigenden Dosis (20). CAP ist dennoch mit Bedacht zu verwenden und sollte je nach Anwendungsgebiet im Hinblick auf die Applikationsdauer und die Auswahl der Plasmaquelle an die spezifischen Anforderungen adaptiert werden (37).

1.3.1 Wirkungsweise von CAP auf Mikroorganismen

Sowohl bei chronischen Wunden als auch bei Osteonekrosen spielen mikrobielle Infektionen eine wichtige pathophysiologische Rolle (4, 6, 11). Entsprechende Studien zeigen, dass die antimikrobielle Wirkung von CAP auf verschiedene Effekte zurückzuführen ist. Hierbei tragen v. a. die reaktiven Spezies ROS und RNS zur Mikrobiozidie von CAP bei. Physiologisch gesehen sind ROS zelluläre Produkte, die während mitochondrialer Stoffwechselprozesse generiert werden (38). Geringe Mengen an ROS bzw. RNS lösen als Mediatoren stimulierende Effekte aus und fördern z. B. die Migration und Proliferation von Zellen. Ein hohes Maß an oxidativem Stress durch ROS führt hingegen bei Mikroorganismen zur Induktion der Apoptose. Die Zellalterung wird zudem beschleunigt, Funktionsproteine werden inhibiert und/oder eine oxidative

Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid [DNA]) herbeiführt (39, 40). Eine der spezifischen Wirkungsweisen wurde bei der Inaktivierung von *Escherichia Coli* (*E. Coli*)-Stämmen gezeigt (33). Durch den von Plasma induzierten oxidativen/nitrosativen Stress findet einerseits eine Depolarisation der Membran und andererseits eine Lipidperoxidation der Lipopolysaccharide der Zellmembranen statt (33). Es kommt daraufhin zu einer Permeabilitätsveränderung der Zellmembran (33). Damit finden ein Verlust der Zellintegrität und eine Exposition intrazellulärer Bestandteile wie DNA, RNA und Proteinen statt (41, 42). Infolge dessen wird der Mikroorganismus inaktiviert. Jedoch kann die Anwesenheit von Antioxidantien in *E. Coli*, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) oder α -Tocopherol (Vitamin E), die Wirkung der durch CAP induzierten Agenzien mindern (33, 43). Studien zeigen, dass die Induktion von ROS/RNS eine Oxidation der Desoxyribose oder eine Spaltung der Phosphatdiesterbindungen bewirken kann (38, 44, 45). Die Abspaltung eines Wasserstoffatoms von der C4'-Position der Desoxyribose resultiert in der Entstehung eines Desoxyribose-Radikals, welches das Herauslösen von bestehenden Nukleotiden initiiert und folglich Einzel- als auch Doppelstrangbrüche herbeiführen kann (44). Es zeigt sich somit, dass Nukleotide bzw. Nukleinsäuren eine verhältnismäßig hohe Empfindlichkeit gegenüber CAP aufweisen. CAP kann durch die o. g. Effekte auf die Genexpression die Zellphysiologie beeinflussen. Entsprechend wurde in *In-vitro*-Studien gezeigt, dass durch CAP induzierter oxidativer Stress bei *E. Coli* unter anderem zelluläre Funktionsproteine inaktiviert und zur chemischen Modifikation von Nukleinbasen führt (46). Durch ROS/RNS in Kombination mit UV-Strahlung und den weiteren Plasmakomponenten erscheint eine mikrobielle Inaktivierung möglich zu sein (46).

Da CAP zum aktuellen Zeitpunkt im Gegensatz zu systemisch und lokal applizierten antimikrobiellen Wirkstoffen nicht von klassischen Resistenzen betroffen ist, kann es unabhängig vom Resistenzstatus auch multiresistente pathogene Mikroorganismen (4, 5, 42, 47), wie Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA) (4, 5, 17), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (24, 48) oder Pilze wie *Candida albicans* (49, 50) inaktivieren und so zur Behandlung chronisch-infizierter Wunden angewandt werden. Insbesondere mikrobielle Infektionen im Zusammenhang mit der Bildung von Biofilmen stellen bei der Chronifizierung von Wunden ein Problem dar. Biofilme sind zusammenhängende Kolonien von Mikroorganismen, die durch eine selbst produzierte extrazelluläre Matrix zusammengehalten werden. Ihr struktureller Aufbau ist multifaktoriell bedingt variabel, demzufolge auch ihr Resistenzstatus bzw. das Ausmaß

an Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Agenzien. Biofilme entwickeln sich auf diversen Oberflächen von menschlichem Gewebe, beispielsweise auf Wundoberflächen (51), auf inneren Organen wie z. B. Herzklappen (52), auf oder in Knochen (53) und auf Zahnhartsubstanzen (54). Die im Folgenden zitierten Studien zeigen, dass die Bildung von mikrobiellen Biofilmen als solche eine erhöhte Resistenz gegenüber systemisch und lokal applizierten antimikrobiellen Wirkstoffen mit sich bringen kann. Bei der Entstehung von mikrobiellen Resistenzen bei chronischen Hautwunden sind die Einzelheiten im Pathomechanismus noch nicht vollständig bekannt, allerdings spielt die Anwesenheit von bestimmten Mikroorganismen wie z. B. *MRSA* eine Rolle. (51, 55, 56). Es wurde hierbei gezeigt, dass für die Widerstandsfähigkeit der Biofilme gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sowohl die extrazelluläre Matrix im Sinne einer Barriere als auch die Anwesenheit von Zellen mit inhärenter Toleranz, den sogenannten Persisterzellen, innerhalb der biologischen Gemeinschaft verantwortlich sein können (57, 58). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass innerhalb des Biofilms lebende Mikroorganismen einen veränderten Stoffwechsel sowie eine erhöhte Mutationsrate aufweisen. Es besteht eine Populationsdynamik beispielsweise durch horizontalen Gentransfer. Nach erfolgter antimikrobieller Therapie können zudem überlebende Persisterzellen Ausgangspunkt für eine erneute Infektion sein (59). Bei der Applikation von CAP auf Biofilmen wurde nachgewiesen, dass ungeachtet der Präsenz einer intakten extrazellulären Matrix Biofilme komplett entfernt werden können, zumindest in Kombination mit einem mechanischen Debridement (48). Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Applikationszeit, die zu einer Schädigung der Integrität der extrazellulären Matrix führt. Es wurde zudem beschrieben, dass die Wirkung von CAP einer enzymatischen Degradation der extrazellulären Matrix ähnelt und somit die Suszeptibilität der Zellen im Biofilm gegenüber den antimikrobiellen Bestandteilen des Plasmas steigert (48).

Studien zeigen, dass Viren, in Abhängigkeit ihres Typus, durch die Verwendung von CAP ohne bekannte Nebenwirkungen inaktiviert werden können (60-62). Hierbei erzielen die von CAP generierten Agenzien synergistisch einen antiviralen Effekt.

Auch wenn der schädigende Einfluss von CAP auf Mikroorganismen erwünscht ist, müssen negative Effekte auf die Zellen des bestrahlten Gewebes nach Möglichkeit ausgeschlossen werden. Eine mögliche mutagene Wirkung auf Säugetierzellen konnte bei der Applikation von CAP zumindest bisher nicht bestätigt werden (63).

1.3.2 Wirkungsweise von Plasmen auf Tumorzellen

Eine selektive Induktion der Apoptose in Tumorzellen gilt in der Onkologie u. a. als wichtiger Ansatz zur Behandlung verschiedener solider maligner Tumore (28). Die Möglichkeit Zellen durch die von CAP generierten Wirkkomponenten in die Apoptose zu führen, bietet einen vielversprechenden Ansatz für die „Plasma-Onkologie“ (64). Obwohl oxidativer Stress mit der Entstehung und der Progression von Tumoren assoziiert ist, stellt dieser auch eine Komponente der herkömmlichen Behandlungsmethoden, wie der Chemo-, Radio- und photodynamischen Therapie dar (65). Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass durch CAP bestrahlte Medien (indirekte Plasmabehandlung) oder die Anwendung von CAP auf Tumorzellen (direkte Plasmabehandlung) z. B. des Osteosarkoms (64, 66, 67) eine antiproliferative Wirkung zeigt. Der Mechanismus, der zur erhöhten Suszeptibilität der Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen gegenüber CAP führt, wird u. a. durch die verstärkte Aufnahme von ROS und RNS herbeigeführt (68). Tumorzellen weisen im Gegensatz zu physiologischen Zellen eine unterschiedliche Zellteilungsaktivität und eine veränderte metabolische Antwort gegenüber induziertem oxidativem Stress auf, was in der Folge zur Apoptose führen kann (65, 68-70).

Bei einem starken intrazellulären Konzentrationsanstieg von ROS werden über entsprechende Signalkaskaden die Apoptose Signal Kinase 1 (apoptosis signal regulating kinase, ASK-1) und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert. Beide Signalproteine führen zur Initiation der Apoptose (39). CAP zeigte weiterhin einen Einfluss auf Tumorsuppressoren, wie z. B. das Tumorsuppressorprotein p53 (71), p21, Caspase-3 (72) oder Bax (71). Eine Akkumulation von p53 spielt eine Rolle beim Erhalt des Genoms, da sie die Antwort auf gentoxischen sowie zellulären, insbesondere oxidativen Stress ist. Je nach Stärke der Akkumulation wird der Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur oder die Apoptose der Zelle induziert (28). Eine hohe Aktivität von p53 führt vor allem zur Aktivierung des Apoptose-Regulators Bax und von Caspasen. Daher inhibiert p53 unkontrolliertes Wachstum und die Entartung von Zellen. Bei der Applikation von CAP auf Tumorzellen wurde eine Induktion von p53 beobachtet (71, 73). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch CAP z. B. p53-mutierte Zellen inaktiviert werden können und aus diesem Grund CAP als potenzielle Tumorthherapie in Betracht gezogen werden könnte (28).

Auch wenn Studien unterschiedliche Plasmaquellen nutzen, ist trotz variabler Methodiken eine selektive Wirkung gegenüber den untersuchten Tumorzellen zu erkennen und darüber hinaus von gesunden Zellen abgrenzbar. Die von CAP induzierten Agenzien führen durch mehrere Signalwege zur Apoptose, Zellzyklusarrest, Nekrose oder Seneszenz (71, 74-76). Wegen der genetischen Variabilität von Tumorzellen sind klinische Anwendungen mit CAP und die Mechanismen der therapeutischen Effekte jedoch noch in den Einzelheiten zu untersuchen.

1.3.3 Einfluss von Plasmen auf wundheilungsfördernde Zellen

Infizierte Wunden zeichnen sich durch eine mikrobielle Besiedlung aus, welche durch die Anwesenheit von multiresistenten Mikroorganismen in dem bedeckenden Biofilm chronifiziert werden können (77). Studien belegen, dass es durch die Anwendung von CAP bei chronisch-infizierten Wunden nicht nur zur antimikrobiellen Wirkung im Wundgebiet kommt, sondern potentiell auch zur Stimulierung von zellulären Reparations- und Regenerationsmechanismen wie z. B. der Matrixsynthese und Vaskulogenese im bestrahlten Gewebe (25, 26, 78, 79). Bei der Pathogenese medikamentenassoziierter Osteonekrosen des Kiefers spielt u. a. eine reduzierte Vaskulogenese des Weich- und Hartgewebes eine Rolle (80). Die von CAP generierten Wirkkomponenten weisen in Studien stimulierende Effekte auf die Migration, Differenzierung, Proliferation von Zellen und der Angiogenese des Knochens und der Haut auf (17, 79, 81, 82). Hierbei sind im Rahmen der Wundheilung bei tier- und humanexperimentellen Untersuchungen u. a. die Stimulation von Immunzellen (83, 84), Osteoblasten (85), Endothelzellen (86), Fibroblasten (87) und Keratinozyten gezeigt worden (17, 88). Entsprechende *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien zeigen eine erhöhte Expression von wundheilungsrelevanten Wachstumsfaktoren, wie dem transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), TGF- β 2 und Zytokine, wie Interleukin-6 (IL-6) und (IL-8) nach der Applikation von CAP (87, 89). Weiterhin wurde in Endothelzellen vermehrt der proangiogenetische Wachstumsfaktor fibroblast growing factor-2 (FGF-2) nachgewiesen (90). Ferner wurde bei *In-vivo*-Studien an Mäusen eine Stimulation der Proliferation der Keratinozyten und dementsprechend eine beschleunigte Reepithelialisierung von Wunden beobachtet (87, 91). Eine Behandlungssitzung dauerte in der Studie zwei Minuten und verlief ohne Auftreten von relevanten unerwünschten Wirkungen.

Die Anwendung von CAP in den hier aufgeführten Studien wirkt sich zusammenfassend positiv auf verschiedene zelluläre Mechanismen der Wundheilung aus. Die kombinierte antimikrobielle und wundheilungsfördernde Wirkung von CAP erscheint daher auch für die Remission von infiziertem spongiösem Knochen erfolgsversprechend.

1.4 Überblick über die Wirkungsweise von Plasmen

Die durch CAP induzierten Agenzien haben zusammen gefasst im Hinblick auf Mikrobiozidie und Tumorthherapie u. a. folgende Effekte:

- Induktion von oxidativem und nitrosativem Stress
- Alteration der Zellintegrität
- direkte DNA-Schäden
- Einleitung eines Zellzyklusarrestes
- Induktion der Apoptose
- Schädigung der Mitochondrien
- Proteinmodifikationen mit Funktionsverlust
- Inhibition der Zellproliferation und -Migration.

Bei der plasmaunterstützten Wundheilung sind u.a. nachgewiesen worden:

- Antiseptik der Wundoberfläche
- Stimulation der Zellproliferation, -migration und -differenzierung
- verstärkte Vaskulogenese des Weich- und Hartgewebes
- Antiinflammation

2 Zielstellung (Problemstellung)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aufbauend auf den bekannten Wirkungsmechanismen von CAP, das antimikrobielle Potential von verschiedenen Plasmaquellen, einem Plasma-Jet und einer DBD-Quelle, in bakteriell infiziertem spongiösem porcinen und humanen Knochen zu untersuchen. Es sollte zusätzlich Hinweise darauf geben, ob die Verwendung von CAP beispielsweise bei bakteriell infiziertem Knochen, wie es bei MRONJ auftritt, ein zukunftsorientiertes, alternatives und unterstützendes Therapieverfahren sein könnte. Die gleichzeitige Analyse von porcinem und humanem Knochen, unter den gleichen Rahmenbedingungen und Dimensionen der Probe, eröffnete die Möglichkeit die Wirkung von CAP auf weitmaschig-spongiösem und spongiösem aber dichterem Knochen zu untersuchen. Das *In-vitro*-Modell war so aufgebaut, dass zusätzlich Erkenntnisse über das Ausmaß der Penetrationstiefe und daher der Tiefenwirkung von CAP gewonnen werden können. Es wurde die antibakterielle Wirksamkeit anhand der ermittelten CFU-Zahlen nach der Verwendung verschiedener Plasmaquellen und etablierter Behandlungsmethoden im Sinne einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle verglichen.

Die von CAP ausgehenden antimikrobiellen Wirkungen sind bislang nicht in allen Einzelheiten untersucht, multifaktoriell bedingt und nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. Das Ausmaß der Wirkung ist von der Art der Plasmaquelle und somit den biologisch wirksamen induzierten Agenzien abhängig. Dabei sind der Applikationsort und die Dosis ebenfalls zu berücksichtigende Faktoren.

Es wurde angenommen, dass die Applikation von CAP unabhängig von der Art der Plasmaquellen im Vergleich zu der Negativkontrolle (0,9% NaCl-Lösung) und den Positivkontrollen (CHX und PDT) einen signifikant größeren reduzierenden Effekt auf die CFU-Zahlen von *Streptococcus mitis* (median logCFU/ml) in infiziertem spongiösem porcinen und humanen Knochen erzielt. Darüber hinaus wurde vermutet, dass sich bei CAP unabhängig von der strukturellen Variabilität des untersuchten Knochens eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen bis zu einer Knochentiefe von bis zu 9000 µm nachweisen lässt.

3 Material und Methodik

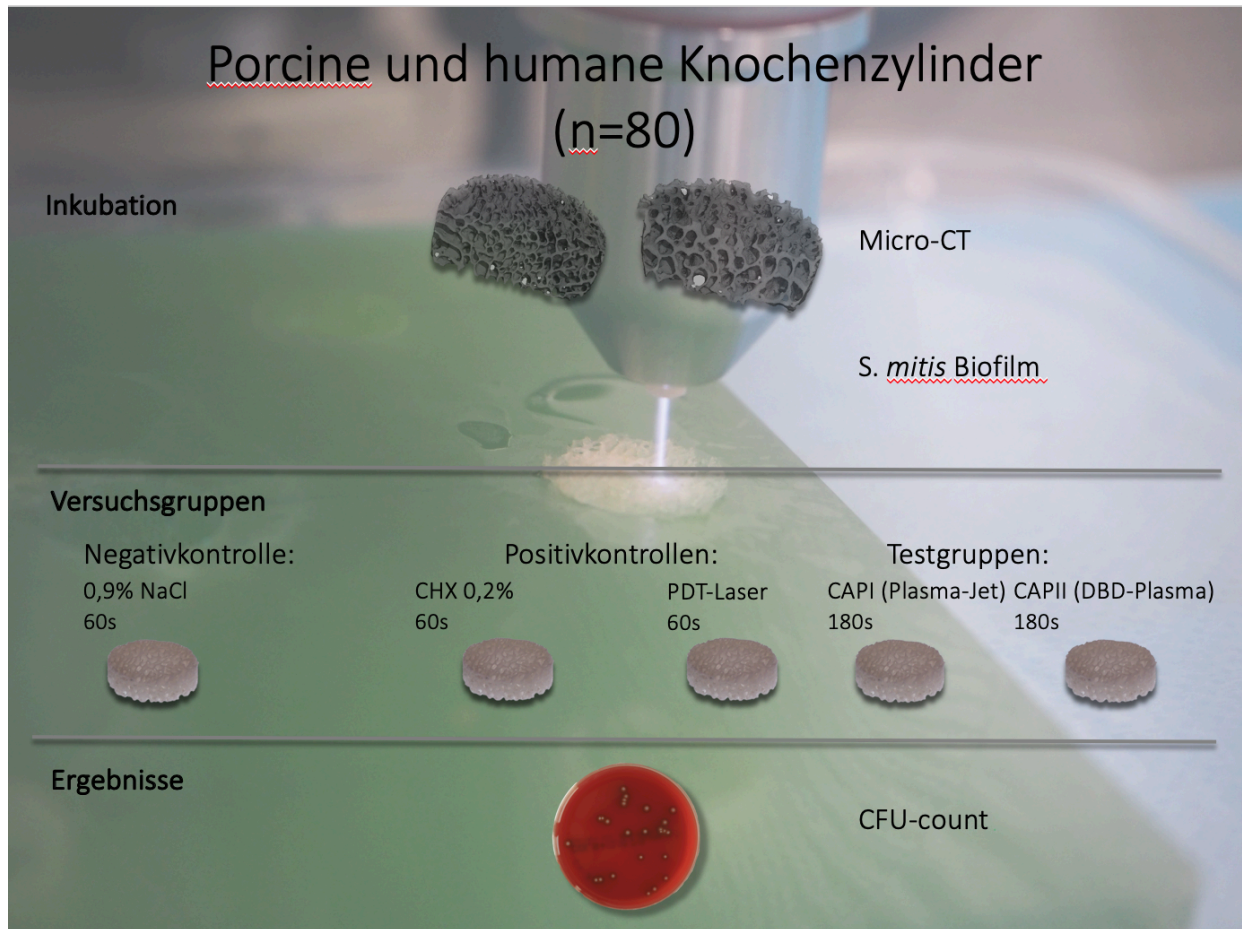


Abbildung 4: Versuchsdesign

Sämtliche Verfahren und Versuche, bei denen humanes sowie porcines Knochenmaterial eingesetzt wurde, wurden entsprechend der ethischen Grundsätze nach der Deklaration von Helsinki für die medizinische Forschung durchgeführt. Der Ethikantrag bezüglich der vorliegenden Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt (EA2/022/16).

3.1 Kultivierung der Bakterien

Streptococcus (S.) mitis ist ein symbiotisch lebendes, in der natürlichen Flora der Mundhöhle vorkommendes fakultativ anaerobes und Gram-positiv klassifiziertes Bakterium. Studien haben gezeigt, dass *S. mitis* ein Initiator von pathogenen Biofilmen sowohl bei immunkompromittierten als auch bei anamnestisch unauffälligen Patienten sein kann (92). So ist *S. mitis* mit einem breiten Spektrum von entzündlichen

Krankheitsbildern assoziiert, wie z. B. Karies oder einer bakteriellen Endokarditis (92, 93). Darüber hinaus ist die Kultivierung von *S. mitis* verhältnismäßig unkompliziert. Die Kulturen von *S. mitis* entstammen dem Leibniz-Institut der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM #12643)).

Zu Beginn der Versuche wurden auf Glasperlen eingefrorene Bakterienstämme von *S. mitis* auf Blutagarplatten (COL+SB Plus, Sifin, Berlin, Deutschland) für 48 Stunden bei 37 °C kultiviert. Da *S. mitis* unter anaeroben Konditionen wächst, wurden die beimpften Blutagarplatten während der Inkubationszeit in hermetisch verschließbaren Behältern gelagert. Um die anaerogenen Bedingungen zu gewährleisten, wurden einerseits ein Indikatorstreifen zur Kontrolle des pH-Werts und andererseits jeweils ein Anaerogen (Oxoid Anaerobic Indicator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zur Eliminierung des im Kulturbedälters befindlichen Sauerstoffs platziert. Nach erfolgter Kultivierung erfolgte zum Nachweis von Gram-positiven Bakterien eine Gramfärbung und eine biochemische Identifizierung (API Rapid ID32 Strep, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zur Verifizierung der Identität der *S. mitis* auf den Columbia-Agar Platten.

3.2 Herstellung der Knochenproben

3.2.1 Porcine Knochenproben

Die zylindrischen Knochenproben für den ersten Teil des Versuchs wurden aus Wirbelkörpern von sieben Monate alten, kommerziell geschlachteten Hausschweinen gewonnen. Für die Gewinnung der Knochenproben wurde ein Trepanbohrer (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Deutschland) mit einem Innendurchmesser von 10 mm mit einer Umdrehungszahl von 15000 rpm unter Kühlung mit steriler Kochsalzlösung verwendet. Die Bohrung erfolgte im spongiösen Teil des Wirbelkörpers lateral des Canalis vertebralis (Abbildung 5). Die Proben wurden anschließend für die Entfernung des Knochenmarks in 100 ml 30%iger H₂O₂-Lösung für 18 Stunden gelegt. Danach wurden die einzelnen Knochenzylinder mit 50 ml destilliertem Wasser für 120 Sekunden gespült.

Im weiteren Verlauf wurden die Proben auf ihre endgültige Dicke von 3 mm geschliffen. Der erste Schritt hierfür war, die Zylinder in eine Bandsäge mit einer Sägebandbreite von

2 mm einzuspannen und den nicht zu verwendenden Teil der Probe unter kontinuierlicher Wasserkühlung abzutrennen. Die Schnittflächen der Proben wurden anschließend auf einer Schleifeinheit (Labo Pol 25, Struers, Willich, Deutschland) unter ständiger Wasserkühlung mit einer Geschwindigkeit von 400 rpm und einem Schleifpapier aus SiC (Siliziumkarbid) mit der Körnung P600 (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) plan geschliffen. Die Proben wurden hierbei mit einem Präzisionsmessgerät kontinuierlich auf das Einhalten einer Schichtdicke von 3 mm überprüft.

Nach dem Schleifen wurden die Knochenproben zur vollständigen Entfernung des restlichen Knochenmarks für weitere 20 Minuten in 100 ml ultraschallaktivierter (Sonorex Super RK 102H, Bandelin, Berlin, Deutschland) 30%iger H_2O_2 -Lösung gelagert. Im Anschluss wurden die Proben erneut mit 50 ml destilliertem Wasser für 120 Sekunden abgespült. Die Knochenzylinder wurden daraufhin verpackt und autoklaviert (Modell 3870 EV, Tuttnauer, Breda, Niederlande). Es wurde darauf geachtet, dass die Proben nach dem Autoklavieren nicht trockneten, um eine Versprödung zu vermeiden bzw. damit die spongiöse Struktur erhalten werden konnte.

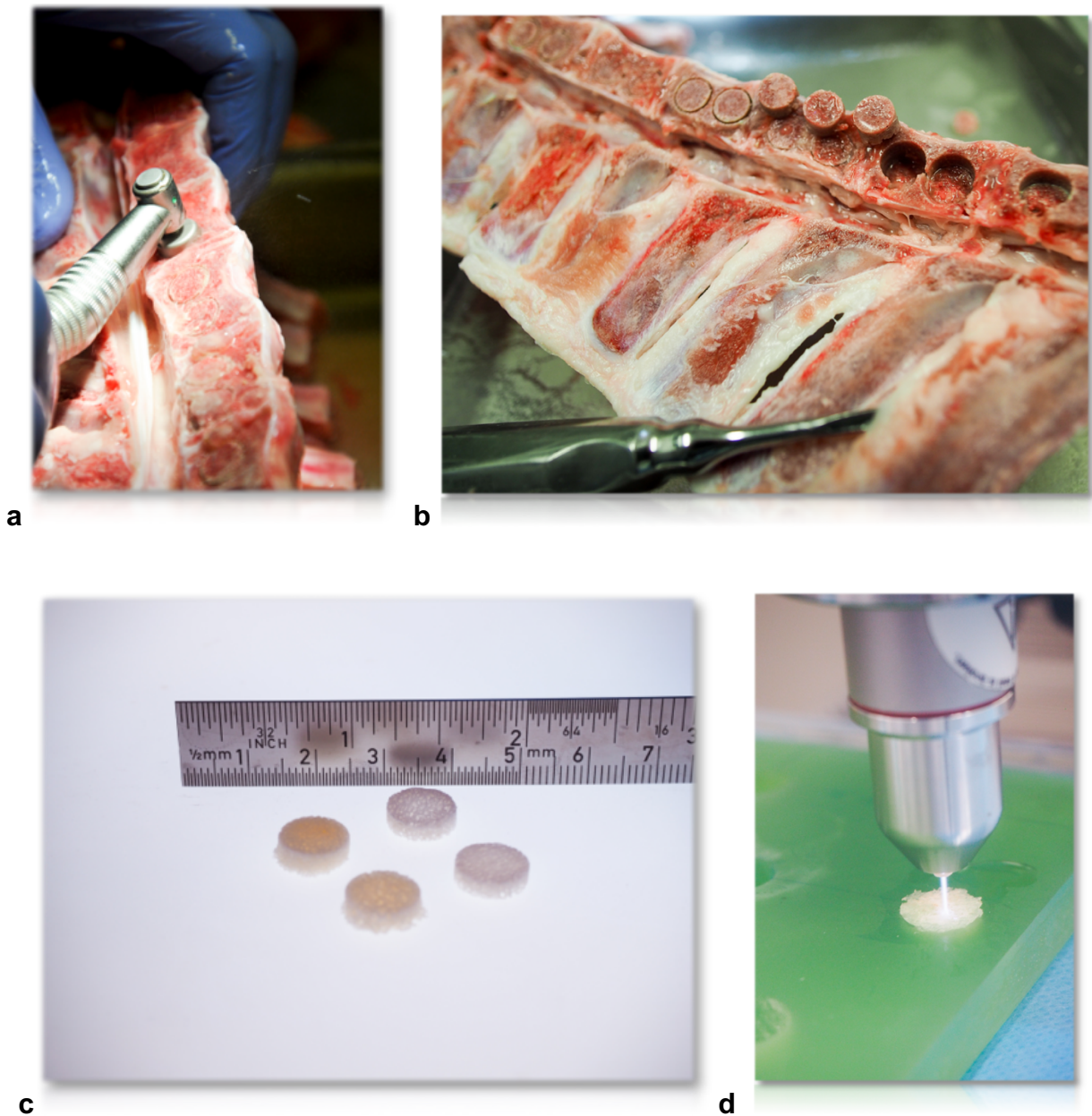


Abbildung 5: Gewinnung der zylinderförmigen Schweineknöchel

a. Trepanbohrung unter kontinuierlicher Wasserkühlung entlang der porcinen Wirbelkörper. **b** Herauslösen der Knochenzylinder mit einem Hebel nach Flohr. Anschließend erfolgte eine Auflösung der weichgewebigen Anteile des Knochens mit H_2O_2 . **c** Nach abgeschlossener Vorbehandlung und Schleifen entstehen zylinderförmige Proben. **d** Im Anschluss an die Inkubation wurden je drei Knochenzylinder im Technovitmodell übereinander gestapelt und der jeweiligen Behandlung zugeführt (hier exemplarisch CAPI).

3.2.2 Humane Knochenproben

Für den zweiten Teil des Versuchs wurde mit Hilfe der Universitäts-Gewebebank des Campus Charité Mitte 120 spongiöse Knochenzylinder aus der Epiphyse von humanen Femurköpfen gewonnen. Die Knochenproben stammen von vier lebenden Körperspendern. Dabei wurde nur Gewebe ohne Nekrotisierungen, sichtbare Verkeimungen oder strukturelle Defekte für die weitere Aufbereitung verwendet. Zu Beginn wurde die bei -80 °C eingefrorene Femurköpfe im Wasserbad aufgetaut. Sie wurden dann im ersten Schritt von anheftendem Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend an einer Bandsäge in Scheiben gesägt. Wie bei den porcinen Proben wurden Knochenzylinder mit einem Durchmesser von 10 mm mit Hilfe des Trepanbohrers gewonnen (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Deutschland). Nach dem Schleifen auf die geforderten Maße ($d = 10 \text{ mm}$, $h = 3 \text{ mm}$) wurden die Knochenproben ausgiebig mit auf 37 °C erwärmter 1%iger NaCl-Lösung gespült.

Zur Entfettung der tiefen spongiösen Strukturen wurden die Knochenproben nach einer Zwischenlagerung zunächst in sterilisierten Folientüten bei -10 °C für 5 Minuten in Aqua ad iniectabilia gewässert. Im Anschluss wurden sie für 2 Stunden in zwei Volumenanteilen Chloroform reinst und einem Volumenanteil Methanol bei Raumtemperatur im Ultraschallbad in einem Becherglas unter dem Laborabzug entfettet. Währenddessen mussten die Knochenzylinder vollständig mit der Lösung bedeckt sein, als Richtwert galt mindestens das dreifache Volumen des Ausgangsmaterials. Um einen optimalen Entfettungsfortschritt gewährleisten zu können, wurde nach 30 Minuten das Medium erneuert. Nach Abschluss des Entfettungsprozesses wurden die Knochenproben achtmal in einem Becherglas mit 400 ml Methanol im Ultraschallbad für jeweils 20 Minuten gespült und zwischen jedem Spülvorgang zusätzlich zweimal mit Aqua ad iniectabilia im Ultraschallbad für 20 Minuten gespült. Zuletzt wurden die Knochenproben bei einer Temperatur von -18 °C in gekennzeichneten sterilisierten Folientüten zwischengelagert.

Für die Sterilisation wurden die Knochenproben im weiteren Verlauf in einen Reinraumbereich überführt. Der Sterilisationsprozess erfolgte in einem Exsikkator (Duran Group, Wertheim, Deutschland), welcher auf einem Laborschüttler (Labor THYS 2, VEB MLW, Ilmenau, Deutschland) zur erforderlichen Agitation gebracht wurde. Der Exsikkator wurde mit den Knochenproben und zusätzlich 6 l einer Lösung aus zwei Volumenanteilen 20 g/l Peressigsäure und jeweils einem Volumenanteil 96 % Ethanol und Aqua ad

infectabilia gefüllt. Auch hier war eine vollständige Bedeckung der Knochenproben mit der Lösung zu gewährleisten. Mithilfe eines Druck-Saug-Aggregats am Exsikkator wurde während des 4-stündigen Sterilisationsprozesses ein Unterdruck von 200 mbar aufrechterhalten. Anschließend wurde die Sterilisationslösung abgesaugt und die Knochenzylinder mit der Soerensen-Puffer-Lösung gespült, bis ein pH-Wert von 7,0 erreicht war. Um eine sichere Entfernung der Peressigsäure zu gewährleisten, wurden die Knochenproben mit dem semiquantitativen Peressigsäure-Test und dem Peroxid-Test (Merckoquant, Merck, Darmstadt, Deutschland) geprüft. Die abschließende Spülung erfolgte mit 3 l Aqua ad infectabilia über einen Zeitraum von 15 Minuten.

Der gesamte Aufbereitungsprozess wurde durch die Lyophilisation in einer Gefrier-trocknungsanlage (TG 5.4, Hochvakuumtechnik, Dresden, Deutschland) abgeschlossen.

3.3 Behandlung der Proben

Die Versuchsdurchführung erfolgte bei den porcinen und humanen Knochenproben zwar getrennt, aber nach dem gleichen Protokoll. Alle folgenden Arbeitsschritte und Versuche wurden zu jedem Zeitpunkt auf einer Laborbank durchgeführt.

3.3.1 Inkubationsphase (Probenvorbereitung)

Die Festkulturen auf den Blutagarplatten wurden zunächst in eine flüssige Kultur auf Basis von Brain Heart Infusion (BHI)-Basis (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) überführt, damit die Knochenzylinder akkurat inkubiert werden konnten. Im ersten Schritt wurde eine Kultur von *S. mitis* für 19 Stunden bei 37 °C in einem Inkubationsbrutschrank gelagert. Hierbei wurden 30 ml BHI-Lösung mit Hilfe einer Impfnadel inokkuliert. Eine Sterilisation im Autoklaven war nach dem Ansetzen des Mediums für die weitere Nutzung obligat. Die BHI-Lösung wurde verwendet, da sie für *S. mitis* ein optimales Nährmedium darstellte. Die genaue Zusammensetzung des Nährmediums war 37,5 g BHI-Pulver (Hirn-Herz-Extrakt 17,5 g/l; Pepton 10 g/l; Glucose 2 g/l; NaCl 5 g/l; Dinatrium 2,5 g/l) in 1 l destilliertem Wasser.

Um eine gleichmäßige Beschickung der Knochenzylinder zu gewährleisten, wurde vor der Infizierung der Proben die optische Dichte der Flüssigkultur photometrisch gemessen (Novaspec II Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, Solingen, Deutschland).

Vorversuche hatten gezeigt, dass eine Verdünnung im Verhältnis von 1:1,4, welches einem Mischungsverhältnis von 15 ml Flüssigkultur mit 21 ml steriler BHI-Lösung entsprach, eine optische Dichte von 0,5 ergab und die Flüssigkultur in ihrem Wachstum keine Degeneration mehr aufwies. Aufgrund dessen war die optische Dichte für alle weiteren Versuchen auf den Wert 0,5 standardisiert.

Im weiteren Verlauf wurden 16 autoklavierte Knochenzylinder in jeweils ein Falcon-Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 50 ml gefüllt und mit 36 ml gemischter Flüssigkultur für 24 Stunden bei 37 °C in einer waagerechten Position in einem Inkubationsbrutschrank inkubiert.

Da sich die Kulturen von *S. mitis* im flüssigen Medium am Boden des Gefäßes absetzten, wurden mit Hilfe der waagerechten Lagerung der Falcon-Röhrchen mit den Knochenzylindern während der Inkubationsphase eine einheitlichere Penetration der Knochenstruktur gewährleistet. Um genügend Raum und Aufnahmefähigkeit jedes einzelnen Knochenzylinders im Falcon-Röhrchen zu garantieren, wurde die Stückzahl auf 16 Knochenzylinder limitiert.

3.3.2 Applikationsphase

Die Technovitblöcke wurden in den Maßen (L x B x H) 11,5 cm x 9,5 cm x 1 cm hergestellt (Abbildung 6). Jeder Block wurde mit 10 Bohrungen mit einem Durchmesser von je 10 mm versehen. Um die Tiefenwirkung der getesteten Agenzien eruieren zu können, wurden die Knochenproben nach der vertikalen Position im Technovitblock in drei unterschiedliche Schichttiefen eingeteilt: P1: 0 – 3000 µm, P2: 3000 – 6000 µm und P3: 6000 – 9000 µm. Hierbei war nur die Oberseite des Knochenzylinders mit einer Fläche von 10 mm² exponiert und die restlichen Oberflächen in das Technovitmodell eingebettet. Dies sollte dem zur Mundhöhle exponierten Knochen entsprechen. Damit eine Kontamination oder einen antibakteriellen Effekt während der Applikation von der benachbarten Probe auszuschließen war, wiesen die Bohrungen Abstände von 2 cm zueinander auf. Nach der Entnahme der Proben aus der Flüssigkultur wurden sie randomisiert in die Technovitblöcke (Technovit 4071, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingelassen. Alle Agenzien wurden auf die exponierte Oberfläche der Knochenproben P1 appliziert.

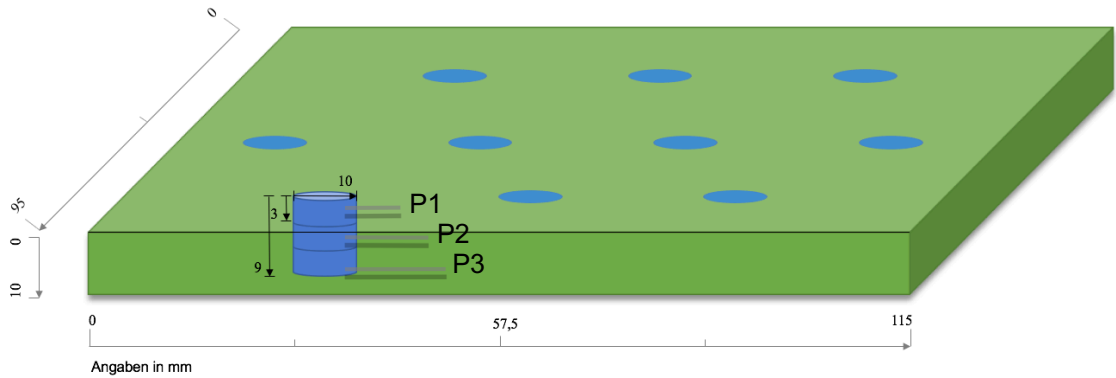


Abbildung 6: Aufbau des Technovitmodells sowie die Anordnung der Slots zur Aufnahme von drei übereinander geschichteten Knochenzylindern (P1; P2; P3)

Die Versuche fanden zu jedem Zeitpunkt mit kontinuierlicher Absaugung der Agenzien statt, sodass eine Kontamination der benachbarten Proben ausgeschlossen war. Die finale Applikation von Natriumchloridspülung (Abschnitt 3.3.2.1.) fand vor der Herausnahme der Knochenzylinder aus dem Technovitmodell statt.

3.3.2.1 Natriumchlorid-Lösung

Als Negativkontrolle wurden Knochenproben mit steriler 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) behandelt. Es wurden 10 ml des Spülmediums konstant innerhalb eines Zeitintervalls von 60 Sekunden mit Hilfe einer elektronischen Pipette (Pipetboy 2, Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz) und einer 10-ml-Glasspitze (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) in einem Abstand zwischen exponierter Knochenoberfläche und Glaspipettenspitze von 8 mm auf das Zentrum der Knochenprobe appliziert. Währenddessen wurden die überschüssigen Mengen an 0,9 % NaCl durch eine Absaugeinrichtung entfernt. Nach dem Spülen wurden die Knochenzylinder einzeln in ein 50 ml Falcongefäß mit 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung überführt. Um die Bakterien aus der dreidimensionalen spongiösen Knochenstruktur herauszulösen bzw. zu planktonisieren, wurden die Knochenzylinder unmittelbar für 10 Sekunden auf einem Vortexgerät geschüttelt. Danach wurden Verdünnungsreihen erstellt und 100 µl der 10^{-3} - 10^{-5} Verdünnung auf Columbia-Agarplatten verstrichen. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die CFU-Counts durchgeführt und statistisch ausgewertet.

3.3.2.2 Chlorhexidin

Die Proben wurden mit Hilfe einer elektronischen Pipette (Pipetboy 2, Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz) und einer 5-ml-Glasspitze (Corning Incorporated Costar Stipette, New York, US) mit 5 ml 0,2 % CHX (Chlorhexamed Forte, GlaxoSmithKline, Bühl, Deutschland) für 60 Sekunden gespült. Im Anschluss folgte eine Spülung mit 5 ml 0,9 % NaCl für 30 Sekunden. In das erste Gefäß der Verdünnungsreihe wurden zu den 930 µl NaCl, 70 µl einer Lösung aus 3 % Tween 80 (Sigma-aldrich Chemie GmbH, Deutschland), 0,75 % L-a-Lecithin (Sigma-aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und 0,43 % Kochsalzlösung zur Inaktivierung des Chlorhexidins hinzugefügt.

3.3.2.3 Photodynamische Therapie

Im ersten Schritt kam es zur Applikation des Photosensitizers (HELBO Blue Photosensitizer, Helbo Medizintechnik, Wels, Österreich). Eine Wartezeit von 60 Sekunden gewährleistete eine ausreichende Penetration des Photosensitizers in die Biofilme und die selektive Markierung der Mikroorganismen. Anschließend wurde die überschüssige blaue Farbstofflösung durch eine 60-sekündige Spülung mit 10 ml 0,9 % NaCl ausgewaschen und abgesaugt. Nun folgte unter Kontakt des Lichtleiters mit der Probenoberfläche die Bestrahlung der Knochenproben mit dem Dioden-Laser (HELBO TheraLite Laser, Helbo, Wels, Österreich) für 60 Sekunden gemäß dem Applikationsprotokoll (Abbildung 8). Durch den Kontakt des Dioden-Lasers kam es zu einer maximalen Aktivierung und Anregung der an den Mikroorganismen gebundenen Photosensitizermoleküle, sodass auch tiefere Abschnitte der Proben möglichst aktiviert werden konnten. Das weitere Prozedere entsprach dem in Abschnitt 3.3.2.1. beschriebene Vorgehen ab der Überführung der Proben in ein Falcon-Röhrchen.

3.3.2.4 Plasma-Jet

Die Behandlung mit dem kINPen MED (neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) erfolgte in einem Abstand von 8 mm zwischen der Spitze des Handstücks und der Probenoberfläche mit einem Argongasdurchfluss von 5 sl/min bei 4.3 bar für 180 Sekunden. Da das Effluent in statischer Applikation nicht die Gesamtheit der

Knochenoberfläche ($d = 10 \text{ mm}$) erreichen konnte, wurden mit Hilfe eines beweglichen Labortisches und einem fixen Applikationsprotokoll (Abbildung 7 und 8) die Knochenproben abgerastert. Die zwei beweglichen, einzeln steuerbaren Achsen erlaubten hierbei eine konstante Bewegung mit $15 \text{ s}/4 \text{ mm}$ zwischen vier statischen Punkten mit einer jeweiligen Verweilzeit von 30 Sekunden pro Punkt. Der Versuch wurde unter kontinuierlicher Befeuchtung der Probe mit $1 \text{ ml } 0,9 \text{ \% NaCl}$ durchgeführt. Die Proben wurden für insgesamt 180 Sekunden mit dem Plasma bestrahlt und im Anschluss für 60 Sekunden mit $10 \text{ ml } 0,9 \text{ \% NaCl}$ gespült. Das weitere Prozedere entsprach dem in Abschnitt 3.3.2.1 beschriebenen Vorgehen ab der Überführung der Proben in ein Falcon-Röhrchen.

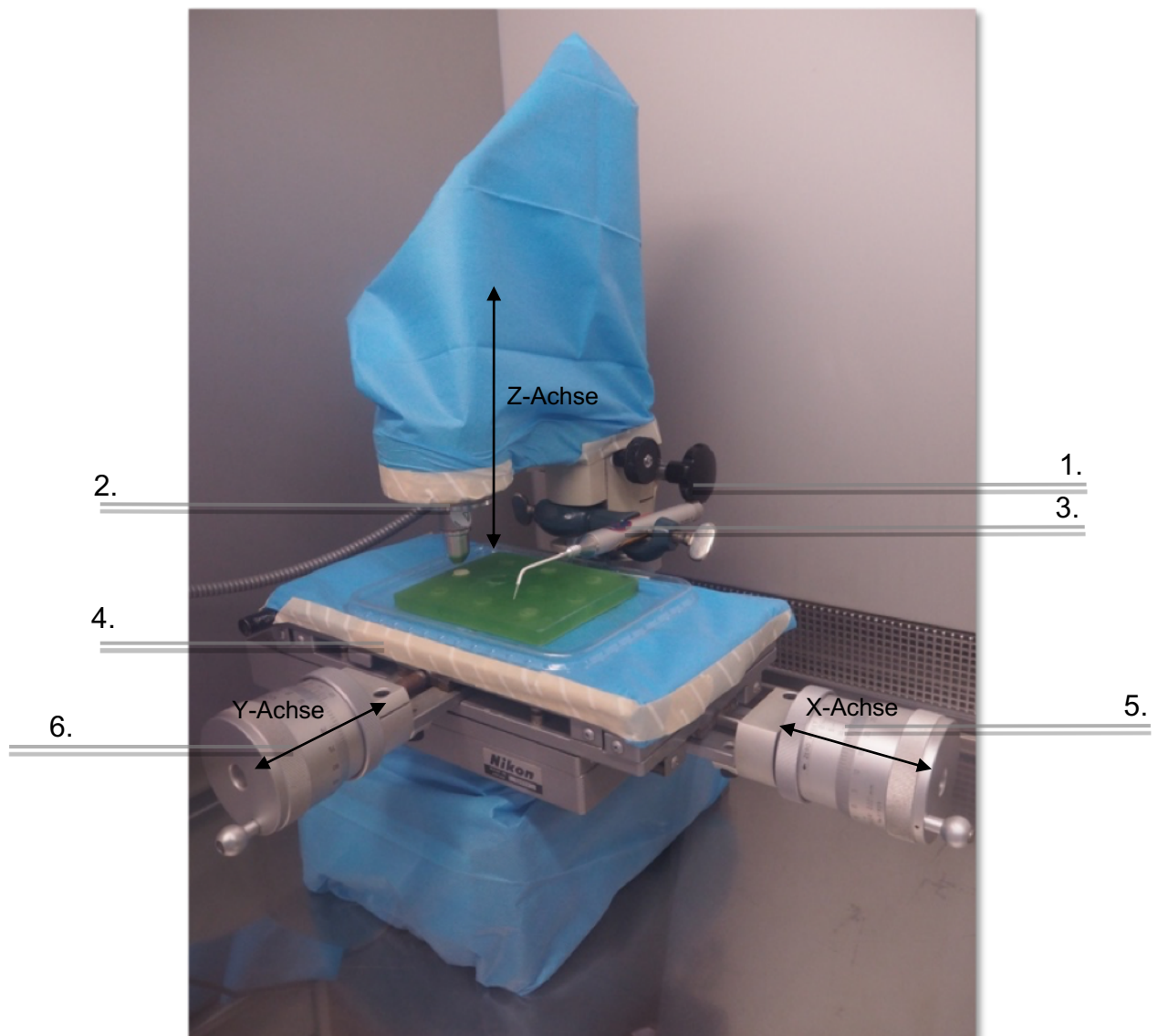


Abbildung 7: Labortisch zur Präzisionsapplikation gemäß Abbildung 8

1. Drehschraube zur Anpassung der vertikalen Position (Z-Achse) des Plasmas und Lasers 2. Einlassöffnung zur Befestigung des kINPen MED Handstückes 3. Halterung mit Klemmschraube für die Positionierung des PDT-Lasers 4. beweglicher Tisch 5. Steuerelement zur Bewegung der X-Achse des Tisches 6. Steuerelement zur Bewegung der Y-Achse

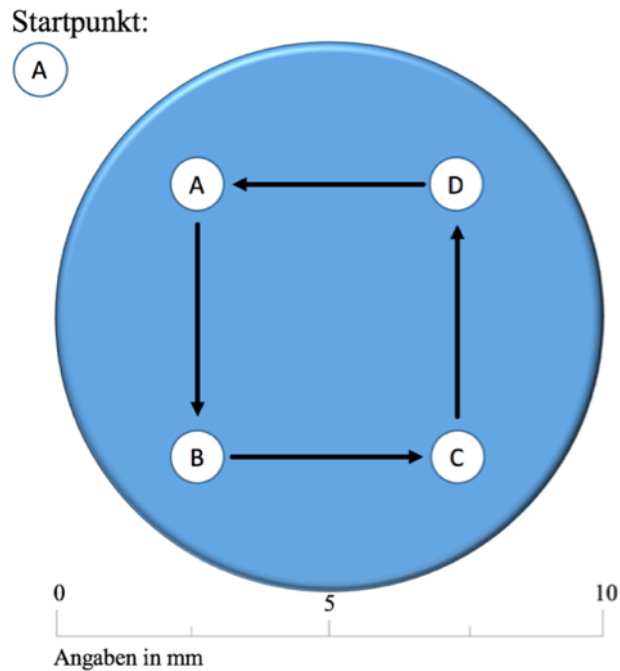


Abbildung 8: Schema zur dynamischen Applikation von CAPI auf der Probenoberfläche

Die vier Stopps A bis D entsprechen jeweils einer zwischenzeitlichen Verweildauer des Plasmajets für 30 Sekunden ohne Bewegung. Die Pfeile symbolisieren eine Bewegung von 4 mm in einer Zeit von 15 Sekunden.

3.3.2.5 DBD-Plasma

Der PlasmaDerm 20MM (CINOGY GmbH, Duderstadt, Deutschland) wurde mit Hilfe eines Abstandshalters in einer Entfernung von 2 mm zur Probenoberfläche fixiert und für 180 Sekunden aktiviert. Hierbei wurde das mit 450 mW versorgte Gerät mit 10 Sekunden anhaltenden zweiphasigen Spannungsimpulsen bei Amplituden bis zu 10 kV und einer konstanten Frequenz von 300 Hz betrieben. Darauf folgte eine Spülung der Probe mit 10 ml 0,9 % NaCl über einem Zeitraum von 60 Sekunden. Das weitere Prozedere entsprach dem in Abschnitt 3.3.2.1. beschriebene Vorgehen ab der Überführung der Proben in ein Falcon-Röhrchen.

3.4 Datenerhebung und -verarbeitung

3.5 Statistische Analyse

Kernpunkt war die statistische Analyse der erfassten CFU-Werte der insgesamt 120 porcinen und 120 humanen Knochenzylinder nach Beendigung der Behandlung, sowie die Evaluation einer Tiefenwirkung der Behandlungsmethoden. Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (IBM SPSS® 21.0, IBM, Armonk, IL, USA) durchgeführt. Mit diesem Test wurde die Reduktion der logarithmischen CFU-Werte (logCFU) der einzelnen Gruppen gegenüber der Negativkontrolle auf statistische Signifikanz überprüft. Weiterhin wurden die logCFU-Werte zwischen den verschiedenen Behandlungsmethoden für jede Schichttiefe verglichen. Die Analyse wurde sowohl für die porcinen als auch für die humanen Proben getrennt und für jede Schichttiefe gleichermaßen durchgeführt. Eine Signifikanz galt bei p -Werten $\leq 0,05$.

3.6 Mikro-Computertomographie

Um strukturelle Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen den porcinen und humanen Knochenproben zu evaluieren, wurden jeweils fünf native, randomisiert selektierte Knochenproben aus den beiden Gruppen untersucht. Sie wurden aus unterschiedlichen Perspektiven mittels Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) (Scanco vivaCT 40, SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Switzerland) dargestellt. Die Bildgebung erfolgte dementsprechend einmal in der horizontalen sowie seitlichen Ansicht und im Querschnitt. Bei den Knochenzylindern handelte es sich um fertig präparierte Proben (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Sie wiesen identische makroskopische Maße von $d = 10 \text{ mm}$ und $h = 3 \text{ mm}$ auf. Die Mikro-CT-Aufnahmen wurde mit einer Schichttiefe von $76 \text{ }\mu\text{m}$ und einem Erfassungsbereich von 10 mm vor der Inkubation mit *S. mitis* und vor der Behandlung der Versuchsgruppen erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 CFU-Counts

4.1.1 Porcine Knochenproben

4.1.1.1 Porciner Knochen. Schicht I – P1: 0 - 3000 µm

Die Analyse der CFU-Zahlen zeigte in Bezug auf die Plasmaquelle CAPI gegenüber der Negativkontrollgruppe in der Schichttiefe I, 0 – 3000 µm, im porcinen Knochen eine hoch signifikante Reduktion der (CAPI vs C; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$). Eine hoch signifikante Reduktion in Relation zur Negativkontrolle wurde in der gleichen Schicht auch für die CHX-Gruppe beobachtet (CHX vs C; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,004$). In den Versuchsgruppen CAPII und PDT waren im Vergleich zur Negativkontrolle keine signifikanten Unterschiede erkennbar (Abbildung 9, $p > 0,05$). Im direkten Vergleich zwischen CAPI und CAPII erreichte CAPI hoch signifikant kleinere CFU-Zahlen (CAPI vs CAPII; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$). Weiterhin führte die Applikation von CAPI ebenfalls zu einer hoch signifikanten Reduktion der medianen logCFU/ml gegenüber der Anwendung von PDT (CAPI vs PDT; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,001$). Die Spülung mit CHX war hinsichtlich der Reduktion der CFU-Zahlen hoch signifikant gegenüber CAPII und im Vergleich zu PDT signifikant (CHX vs CAPII; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,002$; vs PDT; Schicht I: $p_{\text{porcin}} = 0,016$).

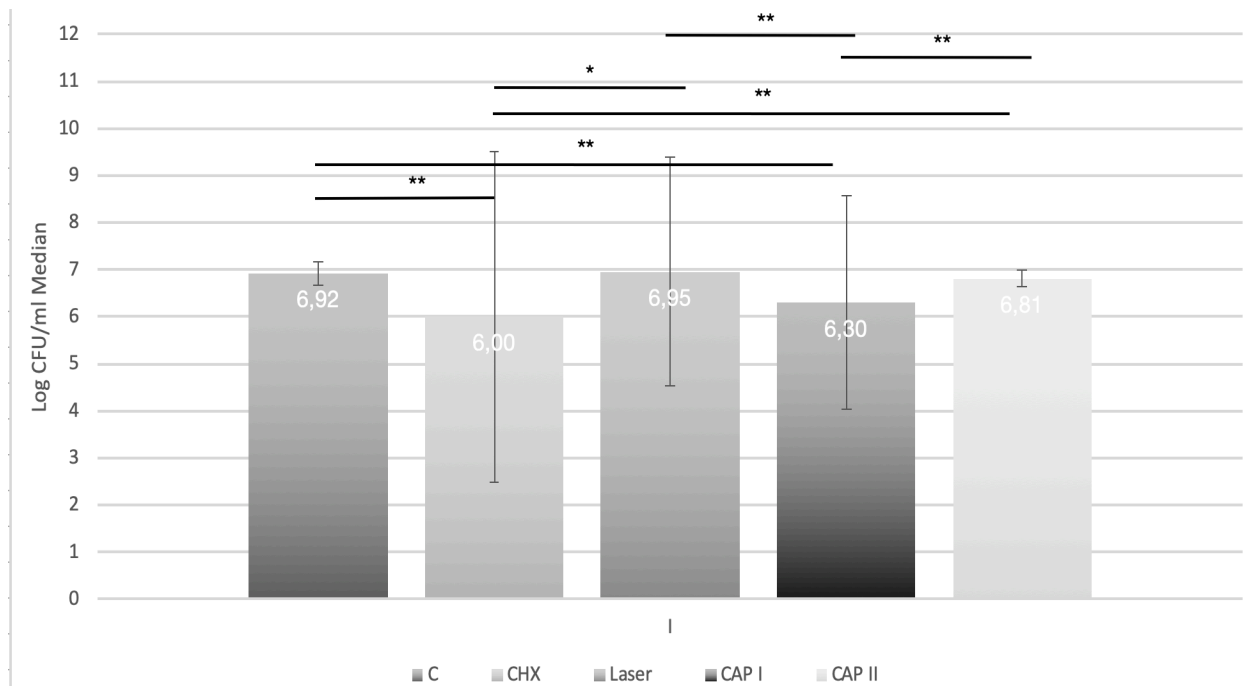


Abbildung 9: CFU-Outcome der porcinen Proben in der ersten Schicht P1: 0 - 3000 μm

(CAPI: kINPen Med; CAPII: PlasmaDerm). Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Eine nicht vorhandene Signifikanz entspricht einem Wert von $p > 0,05$ und wird nicht gesondert markiert. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider.

Abbildung 9 zeigt die Medianwerte der logCFU/ml von Natriumchlorid als Negativkontrollgruppe (C), Chlorhexidin (CHX), photodynamischer Therapie (PDT-Laser), Plasma-Jet (CAPI) und dem Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII).

4.1.1.2 Porciner Knochen. Schicht II – P2: 3000 - 6000 μm

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der CFU-Counts in Schicht II im porcinen Knochen. Sie entsprach dem mittleren Teil des randomisiert vertikal organisierten Knochentriplets (Abbildung 6) und stellte eine Tiefe von 3000 - 6000 μm dar. Die statistische Analyse mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests in Schicht II ergab, dass beim Vergleich beider Plasmaquellen die CFU-Zahlen hoch signifikant durch CAPI reduziert wurden als durch CAPII (CAPI vs CAPII; Schicht II: $p_{\text{porcin}} = 0,002$). In den übrigen Gegenüberstellungen waren die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$).

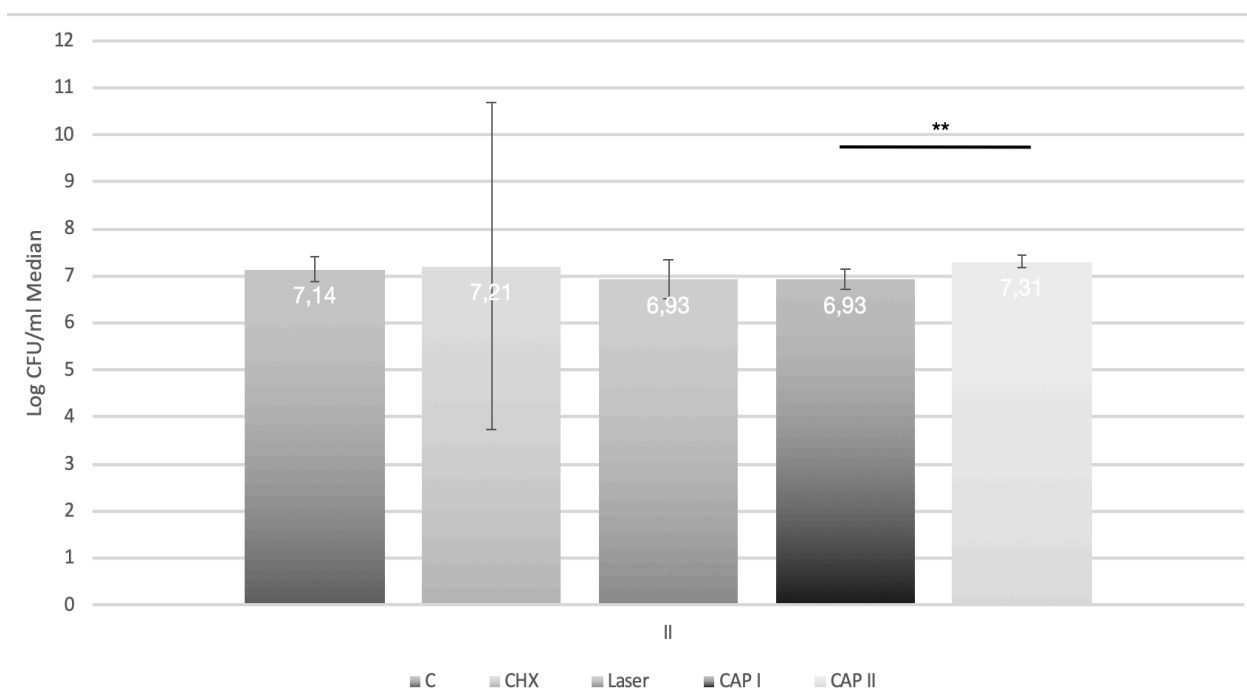


Abbildung 10: CFU-Outcome aller Gruppen der porcinen Proben in der zweiten Schicht P2: 3000 – 6000 μm

Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider. Natriumchlorid (C); Chlorhexidine (CHX); photodynamischen Therapie (PDT, Laser); Plasma-Jet (CAPI); Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII).

4.1.1.3 Porciner Knochen. Schicht III – P3: 6000 - 9000 µm

Die Schicht III stellte im Modell die am tiefsten gelegene Knochenprobe dar. Sie entsprach einer Schichttiefe von 6000 - 9000 µm. Bei Betrachtung des gesamten Knochentriplets waren in der dritten Schicht die höchsten Medianwerte der logCFU/ml zu finden (Abbildung 11). CAPI bewirkte in der tiefsten Schicht III eine hoch signifikante Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle (CAPI vs C; Schicht III; $p_{\text{porcin}} = 0,002$). Der mediane logCFU/ml war nach photodynamischer Laserbehandlung signifikant gegenüber der Kontrolle verringert (PDT vs C; Schicht III: $p_{\text{porcin}} = 0,035$). Im Gegensatz dazu wies die Spülung mit NaCl hoch signifikant kleinere mediane logCFU/ml im Vergleich zur CAPII-Gruppe auf (C vs CAPII; Schicht III: $p_{\text{porcin}} = 0,002$). Weitere Signifikanzen sind in dieser Schichttiefe nicht erkennbar ($p > 0,05$).

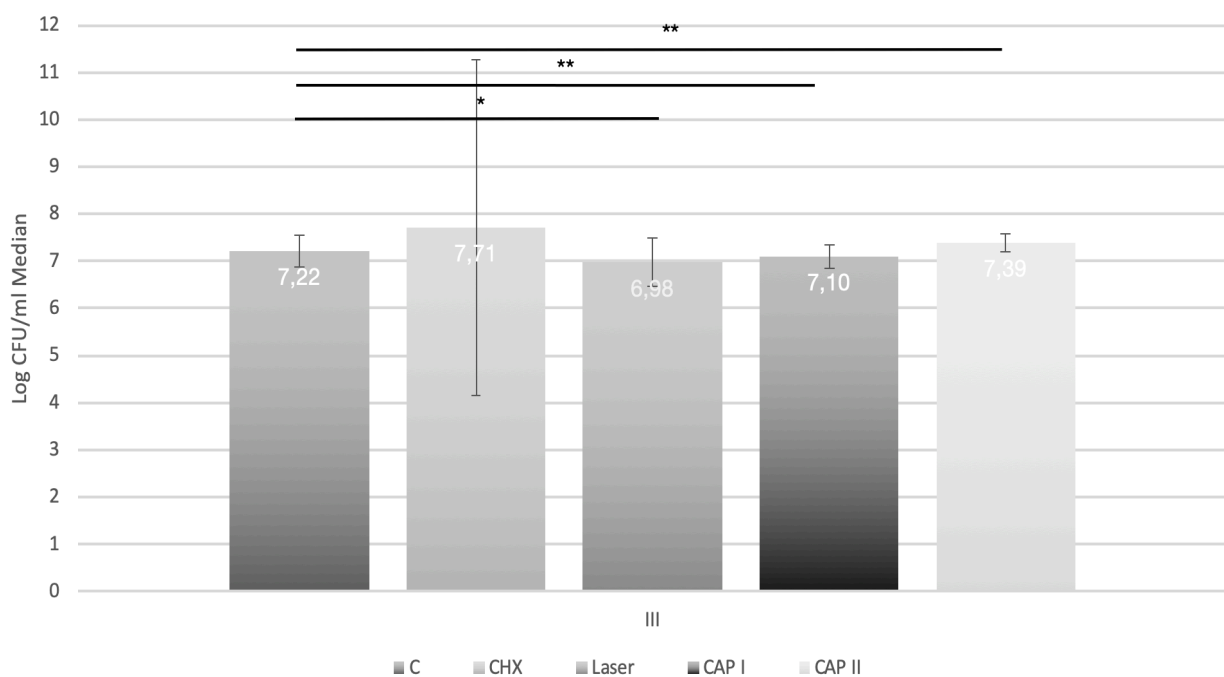


Abbildung 11: CFU-Outcome aller Gruppen der porcinen Proben in der dritten Schicht P3: 6000 – 9000 µm

Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider. Natriumchlorid (C); Chlorhexidine (CHX); photodynamischen Therapie (PDT, Laser); Plasma-Jet (CAPI); Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII).

4.1.2 Humane Knochenproben

4.1.2.1 Humaner Knochen. Schicht I – H1: 0 - 3000 µm

Die Anordnung der humanen Knochenproben entsprach der Positionierung, wie sie in Abbildung 6 dargestellt ist. Die Anwendung von CAPI in Schicht I im humanen Knochen ergab, anders als bei CAP II und dem PDT-Laser, eine signifikante Reduktion der medianen logCFU/ml im Vergleich zur Negativkontrolle (CAPI vs NaCl; Schicht I: $p_{\text{human}} = 0,007$). Darüber hinaus waren bei der Applikation von CAPI signifikant kleinere CFU-Zahlen im Vergleich zu CAP II ersichtlich (CAPI vs CAP II; Schicht I: $p_{\text{human}} = 0,002$). Die weiteren Gruppen erzielten in der Schicht I, 0 – 3000 µm, keine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen verglichen mit der Negativkontrolle (Abbildung 12, $p > 0,05$).

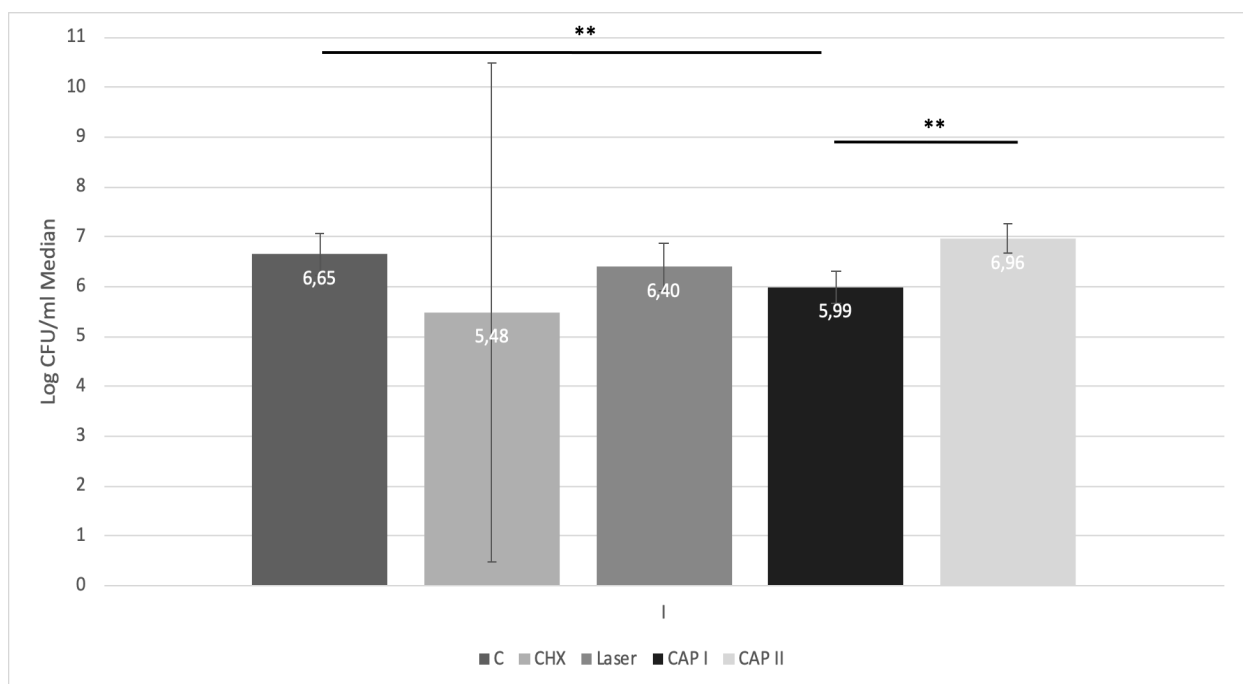


Abbildung 12: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der ersten Schicht H1: 0 - 3000 µm. Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider. Natriumchlorid (C); Chlorhexidine (CHX); photodynamischen Therapie (PDT, Laser); Plasma-Jet (CAPI); Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAP II).

4.1.2.2 Humaner Knochen. Schicht II – H2: 3000 - 6000 μm

In Abbildung 13 ist zu erkennen, dass in der zweiten Schicht im humanen Knochen nur der PDT-Laser eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen gegenüber der Negativkontrolle bewirkte (PDT vs C; Schicht II: $p_{\text{human}} = 0,028$). Die Ergebnisse der übrigen Testgruppen ergaben gegenüber der Negativkontrolle und untereinander keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

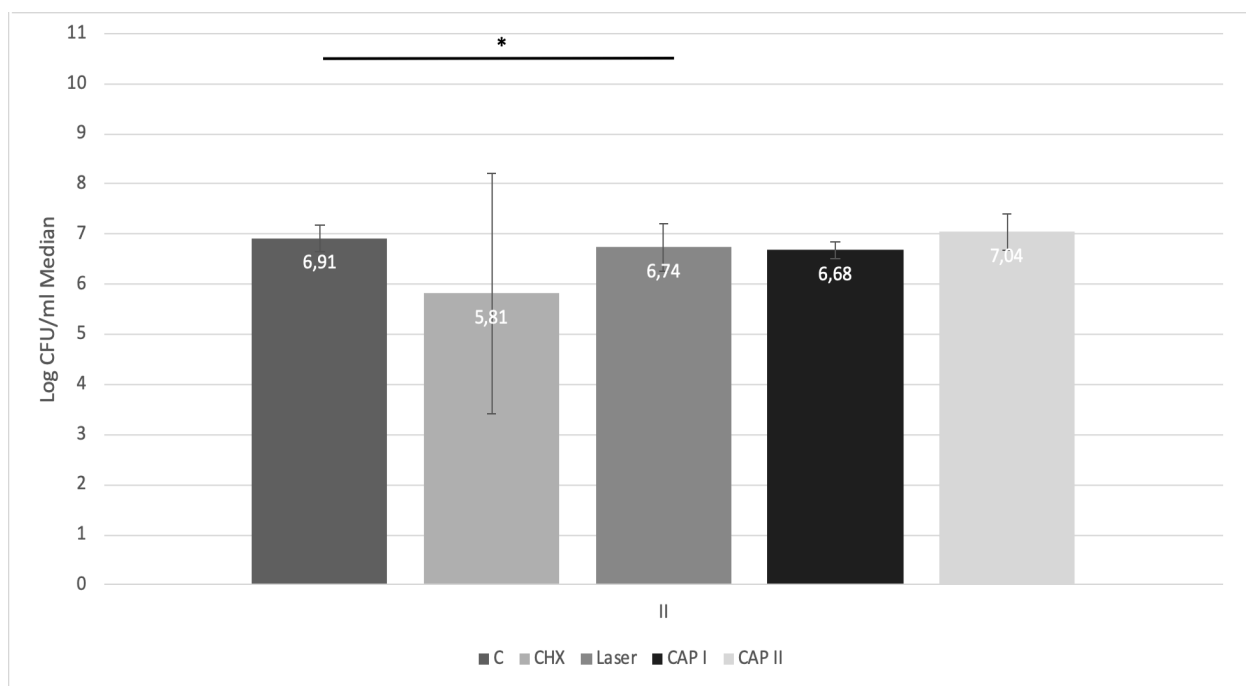


Abbildung 13: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der zweiten Schicht H2: 3000 – 6000 μm . Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider. Natriumchlorid (C); Chlorhexidine (CHX); photodynamischen Therapie (PDT, Laser); Plasma-Jet (CAPI); Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII).

4.1.2.3 Humaner Knochen. Schicht III – H3: 6000 - 9000 μm

In dieser Schicht zeigte sich eine signifikante Reduktion der logCFU/ml nach Behandlung mit CAPI im Vergleich zur Negativkontrolle (CAPI vs C; Schicht III $p_{\text{human}} = 0,038$). Sowohl für CAPI als auch für die anderen Gruppen unterschieden sich die Resultate im Vergleich zur Negativkontrolle oder untereinander statistisch nicht signifikant voneinander (Abbildung 14, $p > 0,05$).

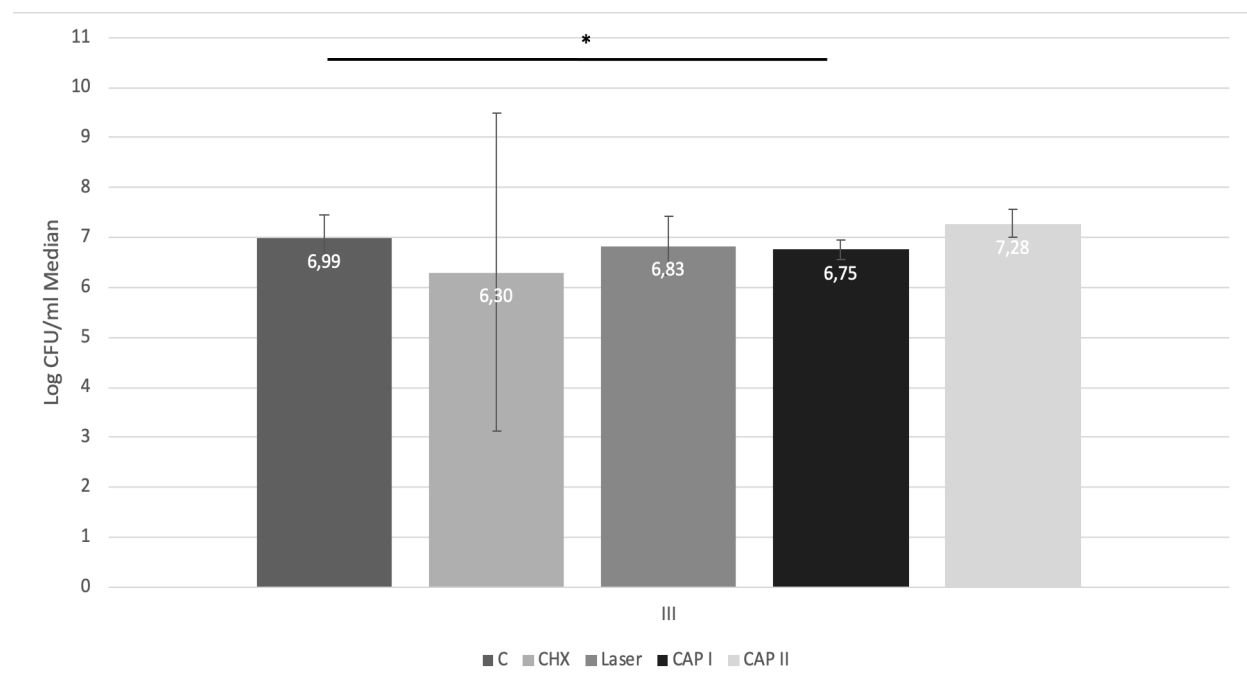


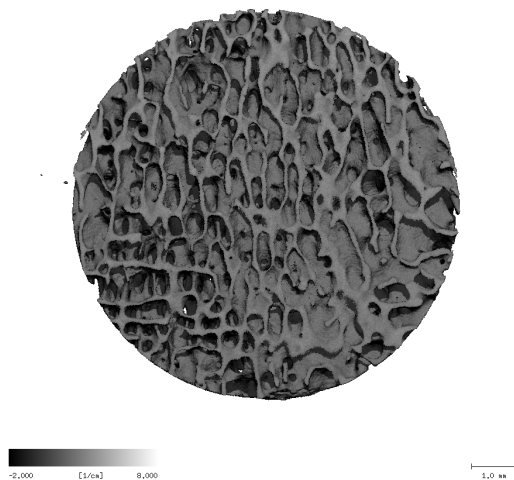
Abbildung 14: CFU-Outcome aller Gruppen der Humanproben in der dritten Schicht H3: 6000 - 9000 μm . Statistische Signifikanzniveaus sind durch: $p < 0,05$ nach dem Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die vertikale Linie spiegelt die Standardabweichung wider. Natriumchlorid (C); Chlorhexidine (CHX); photodynamischen Therapie (PDT, Laser); Plasma-Jet (CAPI); Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII).

4.2 Mikro-Computertomographie

In den Abbildungen 15 und 16 sind jeweils eine repräsentative porcine und eine humane Knochenprobe, vor Beginn der Versuche, in verschiedenen Ansichten in der Mikro-Computertomographie zu erkennen. Untersucht wurde deskriptiv die dreidimensionale Variabilität der Struktur beider Proben.

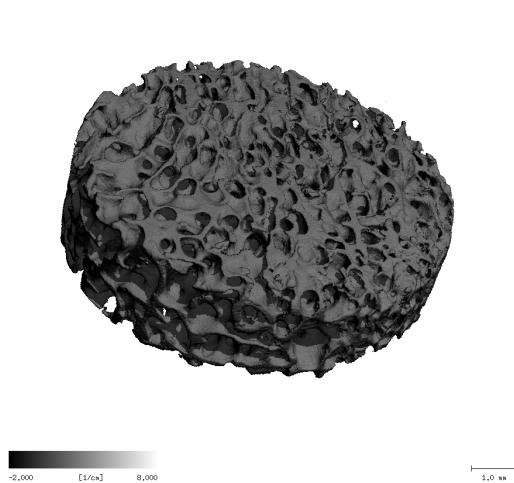
Abbildung 15 Human Knochenprobe

2014_MUG_BRGHI_Voigt



15a Horizontale Ansicht einer humanen Knochenprobe

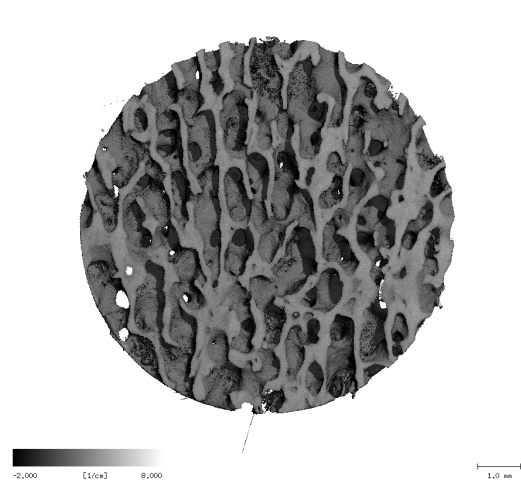
2014_MUG_BRGHI_Voigt



15b Seitliche Ansicht einer humanen Knochenprobe

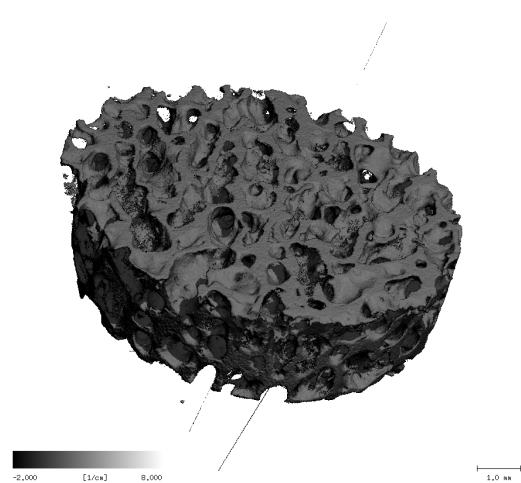
Abbildung 16 Porcine Knochenprobe

2014_MUG_BRGHI_Voigt



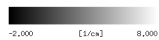
16a Horizontale Ansicht einer porcinen Knochenprobe

2014_MUG_BRGHI_Voigt



16b Seitliche Ansicht einer porcinen Knochenprobe

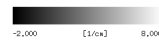
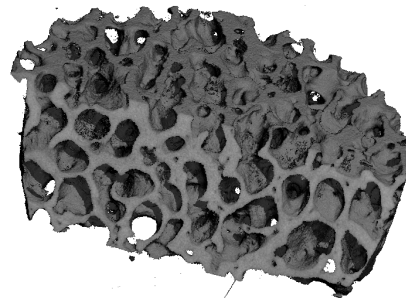
2014_MVG_BRONJ_Voigt



1,0 mm

15c Querschnitt einer humanen Knochenprobe

2014_MVG_BRONJ_Voigt



1,0 mm

16c Querschnitt einer porcinen Knochenprobe

Die Abbildungen 15a und 16a zeigen eine horizontale Mikro-CT-Aufnahme der humanen sowie porcinen Knochenprobe. Auffällig ist, dass im horizontalen Schnitt die Knochentrabekel in der humanen Knochenprobe (Abbildung 15a) dünner als die porcinen Knochentrabekel sind (Abbildung 16a). Betrachtet man den Querschnitt und die seitliche Ansicht der humanen Knochenprobe (Abbildung 15b, c und 16b, c), so ist hier zu erkennen, dass die trabekuläre Struktur des humanen Knochens im Vergleich zum porcinen Knochen feinmaschiger ist. In der Gesamtbeurteilung der Maschenweite in allen Ansichten beider Proben wiesen die Markräume einen vergleichbar dimensionierten Volumenanteil auf.

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung interpretiert und in Bezug zu Forschungsarbeiten anderer Autoren diskutiert. Ziel dieser Studie war es, unterschiedliche Plasmaquellen hinsichtlich ihres antibakteriellen Potentials auf infiziertem spongiösem porcinem und humanem Knochen zu untersuchen. Es wurde angenommen, dass eine Bestrahlung mit dem Plasma-Jet und mit dem DBD-Plasma im Vergleich zu den Positiv- und Negativkontrollgruppen in beiden untersuchten Arten von Knochen zu signifikant kleineren CFU-Zahlen, bezogen auf *S. mitis* führt. Durch die spongiöse Struktur des Knochens wurde weiterhin angenommen, dass die Applikation von Plasma einen signifikant antimikrobiellen Effekt in der Tiefe der Knochentriplets aufweist. Außerdem wurde vermutet, dass die hohe strukturelle Variabilität des spongiösen Knochens die Penetrationstiefe von Plasma beeinflusst.

Bei der Verwendung von CAPI kam es im Vergleich zur Negativkontrolle in der obersten Schicht I (0 – 3000 µm) zu einer signifikanten Reduktion der CFU-Zahlen von *S. mitis*. Dieser reduzierende Effekt auf die CFU-Zahlen konnte sowohl im spongiösen porcinen als auch im humanen Knochen nachgewiesen werden. Dass CAP eine antimikrobielle Wirkung aufweist, wurde bereits in Untersuchungen anderer Autoren mit diversen Keimen belegt. Hierbei wurden z. B. auf Agarplatten kultivierte Streptokokken und Staphylokokken mit CAP behandelt und es wurde in Abhängigkeit von der Applikationszeit und der bakteriellen Spezies eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen beobachtet (94).

Im vorliegenden Studiendesign hatten beide Plasmaquellen direkten Kontakt zur Knochenoberfläche. Der sichtbare blaue Lichtkegel von CAPI adaptierte sich während der gesamten Applikationszeit an die inhomogene spongiöse Knochenoberfläche (Abbildung 2). CAPII lag auf der Oberfläche der ersten Knochenprobe mit einem Abstandshalter auf. Im porcinen und humanen Knochen wiesen die CFU-Zahlen nach Anwendung von CAPII in der ersten Schicht I (Abbildung 9 und 12) keinen signifikanten Unterschied zu den anderen untersuchten Gruppen auf. Es war auch in den tiefer gelegenen porcinen und humanen spongiösen Knochenproben, d.h. den Schichten II und III keine signifikante antibakterielle Wirkung ersichtlich. CAPI wies im Vergleich zu CAPII eine stärkere antibakterielle Wirkung auf, was in der Schicht I der porcinen und humanen Knochenproben (0 – 3000 µm) (Abbildung 9 und 12) zu erkennen war. In Schicht I hatte

CAP I im porcinen Knochen eine hoch signifikant und im humanen Knochen eine signifikant stärkere antibakterielle Wirkung als CAP II. Bei DBD-Quellen wird das Plasma direkt zwischen der dielektrisch isolierten Elektrode und der Applikationsoberfläche generiert. Dadurch kommt es zu einer Emission von reaktiven Spezies und Photonen an der bestrahlten Oberfläche. Das Resultat ist eine Akkumulation der reaktiven Spezies und Photonen auf dieser Fläche (95). Im vorliegenden Studiendesign war die erste Schicht direkt gegenüber der Plasmaquelle exponiert, so dass hier durch CAP II eine antibakterielle Wirkung zu erwarten gewesen wäre. Laut aktuellen Studien zeigen DBD-Plasmen bei Verwendung auf beispielsweise chronisch-infizierten Wunden einen ausgeprägten antibakteriellen Effekt (25, 78). In den zuvor angesprochenen Untersuchungen war jedoch das gesamte behandelte Areal, also die Wundoberfläche, exponiert und konnte durch CAP II vollständig bedeckt werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Spongiosa des porcinen und humanen Knochens eine Penetration der von der DBD-Quelle emittierten Agenzien in tiefere Schichten nicht zuließ oder diese zumindest nicht ausreichend war, um eine signifikante antibakterielle Wirkung analog zu CAP I zu zeigen. Das könnte erklären, weshalb bei CAP II in den Schichten I bis III im untersuchten porcinen und humanen Knochen keine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen von *S. mitis* zu erkennen war (Abbildung 9 - 14). Durch fehlende Studien, die DBD-Plasmen in spongiösem Knochen untersuchen, war der Vergleich mit anderen Untersuchungen eingeschränkt. Jedoch ergibt sich hier ein potenzieller Ansatz für weitere Studien. Die Verwendung von CAP I zeigte weiterhin eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen in der Schicht I des porcinen Knochens gegenüber dem PDT-Verfahren (Abbildung 9). Darüber hinaus war hier ersichtlich, dass die Spülung mit CHX gegenüber der Negativkontrolle die CFU-Zahlen hoch signifikant verminderte. Zusätzlich resultierte die Spülung mit CHX im Vergleich zu PDT in einer signifikanten und in Relation zu CAP II in einer hoch signifikanten Reduktion der CFU-Zahlen von *S. mitis*. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass dieser Effekt nur im porcinen Knochen zu sehen war. Eine entsprechende Wirkung blieb im humanen Knochen aus ($p > 0,05$). Es ließ sich erkennen, dass die Verwendung von CHX einen antibakteriellen Effekt in der Schicht I im porcinen Knochen bewirkte. Der Spülvorgang selbst könnte jedoch ein bedeutender Faktor für die Verringerung der CFU-Zahlen in der ersten Schicht sein, sodass planktonische Zellen von *S. mitis* in tiefere Schichten gespült worden sein könnten.

In der zweiten Schicht II (3000 – 6000 µm) im porcinen Knochen besaß CAPI im Vergleich zu CAPII eine hoch signifikant antibakterielle Wirkung hinsichtlich der Reduktion der CFU-Zahlen (*Abbildung 10*). Im humanen Knochen war in der zweiten Schicht kein antibakterieller Effekt erkennbar. Es kann vermutet werden, dass durch das notwendige Trägergas bei CAPI planktonische Bakterien aus der ersten Schicht in die darunter liegende Schicht II verlagert wurden und aus diesem Grund CAPI insgesamt keine signifikante Verminderung der CFU-Zahlen gegenüber der Negativkontrollgruppe NaCl hatte. Als einzige Testgruppe in Schicht II im humanen Knochen war die Reduktion von *S. mitis* durch PDT gegenüber der Negativkontrollgruppe signifikant. Auch in Schicht III (6000 – 9000 µm) führte die Applikation von PDT im porcinen Knochen im Vergleich zur Negativkontrollgruppe zu signifikant kleineren CFU-Zahlen (*Abbildung 11*). Da sich dies jedoch im humanen Knochen nicht bestätigte, kann angenommen werden, dass eine unvollständige Ausspülung des Photosensitizers in der Tiefe die mögliche Ursache für den beobachteten antibakteriellen Effekt war. Nach der Applikationsphase und bei der Erstellung der Verdünnungsreihe war eine stärkere Blaufärbung im Vergleich zur ersten Schicht I durch den Photosensitizer erkennbar. Sowohl im humanen- als auch porcinen Knochen war mit zunehmender Tiefe makroskopisch eine stärkere Färbung zu sehen. Bei der Spülung des porcinen Knochens mit NaCl in der Negativkontrollgruppe fanden sich im Vergleich zu CAPII in der Schicht III signifikant kleinere CFU-Werte (*Abbildung 11*). Da bei den Testgruppen und so auch bei CAPII die Spülung erst nach der Applikation erfolgte, ist eine Sedimentation von planktonischen Bakterien aus höher gelegenen Schichten über die Zeit nicht auszuschließen. Für die Behandlung mit CAPI fand sich in Schicht III sowohl im porcinen (*Abbildung 11*) als auch im humanen Knochen (*Abbildung 14*) eine hoch signifikant bzw. eine signifikant größere antibakterielle Wirkung im Vergleich zur Negativkontrolle. Plasma-Jets generieren Plasma innerhalb des Handstücks, welches mit Hilfe des Transportgases, zum gewünschten Ort und damit auch in tiefere Schichten transportiert wird. Zusätzlich kann mit der Wahl des Trägergases eine Modifikation der von CAP erzeugten Wirkkomponenten erzielt werden. Die signifikant verminderten CFU-Zahlen in der CAPI-Gruppe im Vergleich zur Negativkontrollgruppe in der obersten und der tiefsten Schicht im porcinen (*Abbildung 9 - 12*) und humanen (*Abbildung 11 - 14*) Knochen könnten auf der Synergie zwischen physikalischen (UV-Strahlungen, leichte Temperaturerhöhung sowie elektromagnetische Felder) und chemischen Wirkkomponenten von CAP (Induktion von reaktiven Spezies wie ROS und RNS) beruhen (96). Die Ergebnisse einer anderen Studie illustrieren das

mikrobiozide Potential von Plasma-Jets *in-vitro* bis in eine Tiefe von 800 µm in Wurzelkanälen (97). Allerdings zeigte die betreffende Untersuchung auch, dass eine Reduktion der getesteten Bakterienstämme oberflächlich und bei einer adjuvanten Verwendung, d.h. in Ergänzung zu Chlorhexidin stärker war. Eine darauf folgende Analyse an gekrümmten humanen Wurzelkanälen verifizierte das Erreichen von tiefer gelegenen Regionen bis zu 1600 µm durch CAPI (22). Basierend auf diesen Studien und den eigenen erhaltenen Ergebnissen kann angenommen werden, dass der Plasma-Jet bei infiziertem spongiösen Knochen eine antimikrobielle Wirkung bis zur untersuchten Schichttiefe von 9000 µm besitzt. Eine vollständige Reduktion der CFU-Zahlen auf 0 konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings weder bei CAPI und CAPII noch bei einer der anderen getesteten Gruppen erreicht werden, unabhängig von der Schichttiefe. Ein Lösungsansatz, um die Wirkung von CAPI sowie CAPII zu verbessern, könnte eine verlängerte Applikationszeit sein. Es wäre möglich, dass eine antibakterielle Wirkung durch CAP bei bestimmten Mikroorganismen bzw. Biofilmen erst ab einer bestimmten Wirkdosis innerhalb der therapeutischen Breite erfolgt. Erst durch eine verlängerte Applikationszeit könnte eine ausreichend hohe Induktion von Ionen, reaktiven Spezies und UV-Strahlen sowohl an der Oberfläche als auch in der Tiefe der Knochenzylinder stattfinden. Die Ergebnisse einer anderen Untersuchung zeigten, dass bei einer Erhöhung der Applikationszeit auf 10 Minuten eine vollständige Inaktivierung von beispielsweise *E. faecalis* Biofilmen realisierbar war (98). Ferner konnte in derselben Arbeit gezeigt werden, dass bei einer längeren Applikationszeit keine unerwünscht starke Temperatursteigerung im Gewebe auftrat.

Grampositive und gramnegative Bakterien zeigen durch ihre unterschiedlich dicke Zellwand und das Vorhandensein einer zusätzlichen äußeren Lipidmembran bei gramnegativen Bakterien eine unterschiedlich hohe Empfindlichkeit gegenüber CAP. Gemeinsam zeigen beide Bakteriengruppen dennoch eine erhöhte Inaktivierungsrate nach verlängerter Applikationszeit (99). Reaktive Spezies, wie ROS oder RNS, könnten durch eine verstärkte Akkumulation mit höherer Wahrscheinlichkeit die Zellintegrität und die Exposition der intrazellulären Bestandteile beeinflussen (41, 42). Darüber hinaus könnte eine gesteigerte Dosis der UV-Strahlung eine mikrobielle Inaktivierung begünstigen. Ein antimikrobieller Effekt von UV-Strahlung und geladenen Teilchen kann auf verschiedenen Wirkmechanismen beruhen, wie Eingangs dargestellt. Beschrieben wurde, dass eine Bestrahlung eine direkte Schädigung des Erbguts bewirken kann (100).

Hierdurch werden DNA-Läsionen herbeigeführt, die sich somit negativ auf intrazelluläre Prozesse auswirken und bis zur Apoptose der Zelle führen können (100). Darüber hinaus wurde in der zu Grunde liegenden Studie beschrieben, dass UV-Photonen optische Desorptionen verursachen und somit in der Lage sind, verschiedene Moleküle in den Mikroorganismen zu lysieren. Auch die vom Biofilm produzierte protektive extrazelluläre Matrix kann durch die Einwirkung beider Agenzien desintegriert werden. UV-Photonen und geladene Teilchen wirken synergistisch mit den generierten reaktiven Spezies, was das antibakterielle Potenzial von CAP steigert (100). Eine entsprechende Untersuchung kam jedoch zum dem Resultat, dass eine Inhibition von Mikroorganismen durch im Plasma generierte UV-Photonen nur in einem limitierten Bereich unterhalb des Plasma-Jet-Effluents erfolgte (46). Bereits ab einer radialen Entfernung von 2 mm zum Plasmakegel werden UV-Photonen von der Raumluft absorbiert und hatten daher keinen Effekt auf Mikroorganismen mehr (46, 101). Eine bakterielle Inaktivierung über diesen umschriebenen Radius hinaus ist aus diesem Grund auf andere Agenzien, insbesondere die reaktiven Spezies, zurückzuführen. Ferner kann man vermuten, dass der Knochen UV-Photonen bereits oberflächlich vollständig absorbiert. Entscheidend für die antibakterielle Wirkung von CAP ist der synergistische Effekt der chemisch und physikalisch generierten Agenzien an der Oberfläche. Dies könnte erklären, weshalb bei CAPI kleinere CFU-Zahlen gegenüber der Negativkontrolle in der Schicht I im porcinen (Abbildung 9) und humanen (Abbildung 12) Knochen als in der Schicht III zu erkennen war. Im humanen (Abbildung 14) und porcinen (Abbildung 11) Knochen der Schicht III könnte durch die Absorption des Knochens und die Abwesenheit von CAP induzierten Agenzien die Inaktivierung der Mikroorganismen reduziert worden sein. In einer Reihe von Untersuchungen, in denen die Komponenten UV-Strahlung und reaktive Spezies isoliert voneinander untersucht wurden, zeigte sich, dass eine Reduzierung der CFU-Zahlen durch die alleinige Wirkung von UV-Photonen erst nach einer verlängerten Applikationszeit von 6 Minuten erfolgte (101). Bei einer kombinierten Verwendung von UV-Strahlen und reaktiven Spezies ist hingegen bereits nach einer Anwendungszeit von 30 Sekunden eine Inaktivierung gegen die getesteten *E. coli* Stämme zu sehen (101). Im Resultat bewirkte die Anhebung der Applikationszeit auf bis zu 6 Minuten eine fortschreitende Reduktion der CFU-Zahlen in allen Gruppen. Die Ergebnisse der *In-vitro*-Untersuchung deuten an, dass das antibakterielle Potential von CAP mit einer Applikationsdauer über 180 Sekunden, wie in den vorliegenden Versuchen verwendet, gesteigert werden könnte. Hierbei lassen auch die Resultate anderer Arbeitsgruppen

vermuten, dass erst die Kombination aller durch CAP erzeugter Komponenten, wie UV-Strahlen, geladenen Teilchen und insbesondere den reaktiven Spezies zu einer signifikanten antibakteriellen Wirkung führt (24, 95, 101). Es erfolgte in den betreffenden Studien eine Inaktivierung der Mikroorganismen durch Schädigung einzelner oder simultan mehrerer Zellkomponenten, wie der Zellmembran, den Nukleotiden oder Proteinen (95, 101). Obwohl diverse Untersuchungen bei einer verlängerten Applikationsdauer in einer verbesserten antibakteriellen Wirkung resultierten, sollten bei einer klinischen Anwendung potentielle Nebenwirkungen durch geeignete Studien evaluiert werden, auch wenn die bisherige Anwendung von CAP am Menschen keine relevanten unerwünschten Wirkungen innerhalb therapeutischer Dosen zeigte (102). Gleichwohl ist zu berücksichtigen, dass durch die generierten reaktiven Spezies potentielle oxidative DNA-Schäden entstehen könnten (103). Bisherige Untersuchungen beschrieben, dass die Wirkung auf Zellen in Abhängigkeit von der Wirkdosis und der Menge an induziertem ROS steht (104). Obwohl die Wirkung von CAP und die Synergie der einzelnen von CAP generierten Agenzien nicht vollständig untersucht sind, ist eine limitierte Behandlungsdauer und somit eine begrenzte Plasmadosis durch eine zellstimulierende Wirkung charakterisiert. Hierbei kann sie insbesondere die Zellproliferation und Migration sowie DNA-Reparaturmechanismen fördern. Da der zelluläre Effekt von CAP von der Expositionszeit auf der bestrahlten Oberfläche und der Mixtur der einzelnen Agenzien abhängig ist, sind hinsichtlich der Nutzung in der Medizin definierte Einstellungen notwendig. Es müsse der Zusammenhang zwischen der Wirkdosis sowie der Komposition der Wirkkomponenten und der daraus resultierenden Wirkung eingehend untersucht werden. Basierend darauf wäre der Maximaleffekt individuell im verwendeten Therapiebereich kalkulierbar und eine Reduktion von potentiell auftretenden Nebenwirkungen möglich bzw. besser vorhersehbar. Aktuelle Studien zeigen, dass eine intentionierte hohe Konzentration durch Plasma generierter reaktiver Spezies ein mutagenes Potential aufweisen kann (104, 105). Zudem fand durch den erzeugten oxidativen Stress eine Initiierung der Apoptose über verschiedene Signalkaskaden, eine Veränderung der Membranintegrität, eine beschleunigte Seneszenz und Inhibition von Proteinen statt (40, 106). Jedoch sind die durch CAP initiierten DNA-Schäden reversibel (107). In einer klinischen Studie an Mäusen wurde die Anwendung des kINPen zur Wundheilung untersucht. Nach einem Jahr wurden neben der Stimulation von Zellen zur Wundheilung keine proinflammatorischen Zytokine wie der TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und IL-1 β gefunden (108). Darüber hinaus trat eine

Tumorgenese nicht auf (108). Die Ergebnisse einer anderen Studie machen deutlich, dass bei der Verwendung von DBD-Plasma zur Wundheilung eine stimulierende Wirkung nachweisbar war und gleichzeitig ein zytotoxischer Effekt erst bei einer Applikationsdauer ab 300 Sekunden potentiell auftreten könnte (109). Bisherige *In-vivo*-Studien in der Dermatologie zur Behandlung chronisch-infizierter Wunden zeigten außerdem, dass bei der adjuvanten Applikation von CAP bei einer Applikationszeit von 2 Minuten keine irreversiblen unerwünschten Effekte auftraten (26). Es wurde sogar beobachtet, dass langzeitliche negative Auswirkungen bei einer Steigerung der Anwendungszeit auf bis zu 11 Minuten nicht auftraten (25). Ferner konnten schädigende UV-Strahlendosen und Temperaturerhöhungen auf der Haut nicht nachgewiesen werden, da das Stratum corneum der Haut den Großteil der von CAP generierten UV-Strahlen absorbiert und die emittierte Dosis nach aktuellem Kenntnisstand bei Limitation der Applikationszeit unterhalb der für humanes Gewebe schädigenden Größenordnung liegt (20). Allerdings ist eine Übertragung der Ergebnisse auf die Mundhöhle nur bedingt möglich, da die Mundschleimhaut in Abhängigkeit von der Lokalisation einen variablen histologischen Aufbau besitzt. Aus diesem Grund müssen weitere Studien folgen, die die Verwendung von CAP in der Mundhöhle untersuchen. Inwiefern eine verlängerte Anwendung von CAP Langzeitnebenwirkungen verursacht, kann nach heutigem Stand der Forschung jedoch noch nicht eindeutig gesagt werden und mögliche Pathomechanismen sollten durch entsprechende Studien untersucht werden. Aufgrund dessen, dass innerhalb der therapeutischen Breite keine anhaltenden Nebenwirkungen nachgewiesen werden konnten, erweist sich eine Nutzung von CAP am Menschen für eine antibakterielle und wundheilungsfördernde Therapie als wirkungsvoll und vielversprechend. Außerdem reduziert im Vergleich zu konventionellen Therapien CAP als non-invasives und schmerzloses Verfahren die Belastungen für den Patienten. Ob nun eine erhöhte Anwendungszeit zu einer verstärkten Reduktion der CFU-Zahlen oder sogar eine vollständige Biofilm-Elimination erreicht worden wäre, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden und zeigt die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Eine Desinfektion setzt eine Reduktion der Bakterienlast um mindestens fünf log-Stufen und eine Sterilisation um mindestens sechs log-Stufen voraus. Obwohl im vorliegenden Studiendesign CAP kein desinfizierendes oder sterilisierendes Niveau erreicht wurde, kann man sagen, dass eine supportive Applikation von CAP bei Knocheninfektionen eine non-invasive und erfolgsversprechende Therapiealternative darstellt. Insgesamt wies die Mehrheit der Studien eine Reduktion der CFU-Zahlen und je nach therapeutischem

Einsatz von CAP eine stärkere oder vollständige Reduktion der Bakterien auf. Hierbei wurde eine Inaktivierung der Bakterien sowohl bei direkten als auch indirekten Plasmaquellen erreicht. Es ist jedoch zu beachten, dass CAP in den vorliegenden Studien zumeist als Add-on zur Standardtherapie verwendet worden ist, was die Frage aufwirft, inwiefern CAP als alleinige Therapieform wirksam ist. Eine adjuvante Applikation von CAP bei z. B. chronischen Bein-Ulzera zeigte eine signifikante Reduktion der Bakterien auf der Wunde sowie einen bis zum finalen sekundären Wundverschluss reichenden heilungsfördernden Effekt nach sieben Wochen (25). Das Ergebnis einer weiteren Untersuchung war, dass CAP sogar bei kurzen Anwendungen eine antibakterielle Wirkung auf chronisch-infizierten Wunden besaß, unabhängig von der bakteriellen Spezies und dem Resistenzlevel der Mikroorganismen (26). Bei verlängerter Applikationszeit und folglich erhöhter Wirkdosis besaß CAP überdies die Fähigkeit, vollständige *E. faecalis*-Biofilme zu inaktivieren (98). In der vorliegenden Arbeit wurde das antibakterielle Potential *in-vitro* ausschließlich an Biofilmen von *S. mitis* untersucht, was, wie zuvor erwähnt, die Vergleichbarkeit einer Anwendung in oralen oder extraoralen Wunden limitiert. Da infizierter extraoraler oder intraoraler Knochen mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Pathogenen besiedelt ist, sind zur Klärung der antimikrobiellen Wirkung unter realen Bedingungen klinische Untersuchung auf infiziertem exponiertem Knochen mit einem großen Patientenkollektiv notwendig. Da eine vollständige Inaktivierung der *S. mitis*-Biofilme weder durch die Applikation von Plasma-Jet noch der DBD-Quelle erkennbar war, sollte vorerst eine adjuvante Applikation von CAP auf infiziertem spongiösem Knochen erfolgen. Die erhaltenen Ergebnisse veranschaulichen hierbei die Schwierigkeit einer vollständigen Knochendesinfektion und das hohe Risiko einer Reinfektion. Die Verwendung von CAP mit dem Plasma-Jet zur bakteriellen Inhibition und Remission von infiziertem spongiösem Knochen scheint jedoch erfolgsversprechend.

Als eine Nebenwirkung, die bei einer antiresorptiven Therapie auftreten kann, bei denen sich unter speziellen Vorerkrankungen eine MRONJ anschließt, ist auch eine Inhibition der Endothelzellproliferation festgestellt worden (110). Eine gestörte Angiogenese verzögert einerseits die Wundheilung und kann andererseits zu einer avaskulären Knochennekrose führen (110). Eine Studie beschrieb, dass bereits eine kurze Behandlung mit CAP zu einer Induktion der endothelialen Zellproliferation und -migration führen kann und sich so proangiogenetisch auswirkte (86).

Im Knochen besitzt das Protein VEGF (vascular endothelial growth factor) bei der Knochenheilung und -regeneration eine wichtige Funktion. VEGF wirkt regulatorisch auf Osteoblasten, Osteoklasten und Endothelzellen und ist insbesondere ein Initiator bei der Vaskulogenese im Knochen und zusätzlich bei der Osteogenese beteiligt (111). Eine hohe Konzentration von VEGF führt zur gesteigerten Vaskulogenese in Knochengewebe und begünstigt die Osteoblastendifferenzierung sowie die Knochenmineralisation. Ein Defizit an VEGF würde eine mangelnde Interaktion zwischen dem Knochengewebe und den enthaltenen Blutgefäßen herbeiführen und sich inhibitorisch auf die Knochenheilung auswirken (111). Hierdurch könnte die Ausheilung von Knochenerkrankungen, Knochenaugmentation und -transplantation oder eine implantäre Osseointegration eingeschränkt werden. Entsprechende Untersuchungen fanden heraus, dass ROS über verschiedene Signalkaskaden proangiogenetische Faktoren, u. a. VEGF und FGF, stimulieren (81, 89). Dies zeigt, dass CAP potenziell in der Lage sein könnte, die Knochenheilung durch eine Stimulation der Endothelzellproliferation und -migration in das Knochengewebe positiv zu beeinflussen und es somit eine sinnvolle ergänzende Therapie bei der Behandlung von Knochenwunden sein könnte. Hinsichtlich knöcherner Defekte bewirkten die von CAP generierten Agenzien, insbesondere ROS, *in-vitro* bei mehrfacher Therapiesitzung außerdem eine beschleunigte osteoblastische Differenzierung (82, 85). Der genaue Mechanismus bleibt unklar. Dennoch zeigen die Studien und die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, dass CAP in Kombination mit seinem antimikrobiellen Effekt und der Möglichkeit einer verbesserten Knochenregeneration die mikrobielle Besiedlung bei chronischen Knocheninfektionen vermindern und als Add-on-Therapie eine Ausheilung des Knochens beschleunigen könnte (82, 85). CAP könnte also durch seine physikalischen und chemischen Wirkkomponenten bei knöchernen Erkrankungen, wie der MRONJ, den Heilungsprozess unterstützen.

Auch bei der Entstehung von Mukositisen oder Periimplantitiden spielen bakterielle Biofilme auf der Implant- oder Wurzeloberfläche eine wesentliche Rolle. Untersuchungen ergaben, dass CAP einen antibakteriellen Effekt auf Implantatoberflächen besitzt und die Benetzbarkeit für u. a. Preosteoblasten-Attachments steigert (112-114). Insbesondere die Anwendung eines Plasma-Jets bei Periimplantiden erscheint daher sinnvoll (115).

Da die bakterielle Kolonisation von Knochen eine Relevanz bei der Entstehung von Knochenerkrankungen hat, sollte aufgrund des aufgeführten breitgefächerten antimykotischen, antiviralen und antibakteriellen Potentials sowie der

wundheilungsfördernden Wirkung die Verwendung von CAP nicht nur bei Infektionen der Haut, sondern auch des Knochens berücksichtigt werden. Histopathologische Untersuchungen bei unterschiedlichen Knochenerkrankungen wie Osteomyelitiden, Osteoradionekrosen oder MRONJ haben gezeigt, dass eine mikrobielle Besiedlung nachgewiesen werden konnte (7). Dies unterstreicht somit die Notwendigkeit einer Reduzierung der mikrobiellen Last des Knochens, um eine langfristige Remission der erkrankten Patienten erreichen zu können (7).

In der vorliegenden Studie wurde *S. mitis* als alleiniger Bakterienstamm untersucht. Dieser ist ein in der Mundflora physiologisch auftretender Keim und spielt bei der Entstehung und Kolonisierung von Biofilmen eine wichtige Rolle (92). Auch wurde gezeigt, dass *S. mitis* grundsätzlich opportunistisch als Pathogen wirken kann und in der Lage ist Resistenzen hinsichtlich Antibiotika zu entwickeln (92). Eine Untersuchung, die die antibakterielle Wirkung von CAP, CHX sowie PDT auf in-situ gewachsenen Biofilmen auf Titanplatten vergleicht, kam zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Studie. Bei jeder der getesteten Gruppen kam es zu einer antibakteriellen Wirkung in Relation zu einer Negativkontrolle, jedoch erzielte CAP im Vergleich zu CHX und PDT eine stärkere Reduktion des Biofilms (116). Allerdings wurden die Niveaus Desinfektion und Sterilisation und somit eine komplette Biofilm-Elimination bei allen getesteten Gruppen nicht erreicht.

In der CHX-Gruppe zeigten sich in der Schicht I im porcinen Knochen (Abbildung 9) signifikant kleinere CFU-Zahlen im Vergleich zur Negativkontrolle, CAPII und PDT. In den tieferen Schichten im porcinen Knochen wurde jedoch keine signifikante Reduzierung der CFU-Zahlen gefunden. Eine antibakterielle Wirkung im humanen Knochen konnte in keiner Schicht nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass die Reduktion der Bakterienzellen in der Schicht I im porcinen Knochen allein durch die mechanische Spülung erzielt worden ist und dieser Effekt mit der Tiefe abschwächt. Darüber kann diskutiert werden, inwiefern CHX keinen antibakteriellen Effekt zeigen konnte, da die Bakterien in unempfindliche Biofilme in der Knochenstruktur eingebettet waren (117). Die Unerreichbarkeit der *S. mitis*-Biofilme zwischen der sehr variablen und engmaschigen Spongiosa im humanen- und porcinen Knochen, könnte somit eine antibakterielle Wirkung durch CHX verhindert haben. Zusätzlich lässt sich der Einfluss von CHX wegen der hohen Variabilität der CFU-Zahlen in der CHX-Gruppe nur bedingt beurteilen. Eine

Ursache könnte das Verbleiben von CHX in den unregelmäßigen Hohlräumen des Knochens sein, die eine zeitlich versetzte Nachwirkung herbeiführen würde (118).

PDT hatte keinen signifikanten Effekt in der Schicht I im humanen- und porcinen Knochen (Abbildung 9 und 12), obwohl der Photosensitizer in Schicht I die größte Lichtmenge absorbieren konnte. Durch die Applikation des Photosensitizers kam es trotz einer anschließenden Spülung mit NaCl nach der Penetrationszeit zu einer eindeutig sichtbaren Färbung aller getesteten Präparate in jeder Schichttiefe der PDT-Versuchsreihen. Die Vermutung liegt nahe, dass der Verbleib von überschüssigen Mengen an Photosensitizer nach der Spülung in den Strukturen des Knochens zur Elimination von *S. mitis* in Schicht II und III führte. Die Persistenz des Photosensitizers in den Proben ließ sich ebenso anhand der Blaufärbung der Flüssigkeit in den Verdünnungsreihen verifizieren. Die Schicht III zeigte im Vergleich zu den darüberliegenden Schichten die makroskopisch stärkste Färbung nach der Spülung mit NaCl. Eine Studie konnte nachweisen, dass der Photosensitizer ohne eine aktive Lichtaktivierung zelltoxische Eigenschaften besitzt (119). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass der in die Tiefe gespülte, nicht inaktivierte Photosensitizer in der Schicht III im porcinen Knochen (Abbildung 11) und zweiten Schicht des humanen Knochen (Abbildung 13) ursächlich für die signifikante Reduktion gegenüber der Negativkontrolle war. Da bei der PDT-Therapie das aktivierende Licht eine essentielle Rolle bei der Aktivierung des Photosensitizer spielt und erst durch die Kombination beider Komponenten das maximale antibakterielle Potential in Kraft tritt (120), ist die Blockade des erzeugten Lichts gravierend für die antibakterielle Wirkung der photodynamischen Therapie. Daher wurde vermutet, dass die dichte und sehr variable Struktur im Knochen eine zusätzliche Wirkung verhinderte und in der ersten Schicht kein antibakterieller Effekt zu sehen war.

Insgesamt zeigt die Mehrzahl der vorhandenen Untersuchungen einen antibakteriellen und wundheilungsstimulierenden Effekt von CAP. Allerdings besteht wegen der unterschiedlichen Plasmaquellen und Geräteeinstellungen in den zitierten Studien keine standardisierten Bedingungen für die Anwendung. Andererseits bringt die Anwendung verschiedener CAP-generierender Geräte und dessen Modifizierbarkeit den großen Vorteil, dass CAP an bestimmte medizinische Indikationsbereiche adaptiert werden kann. Es kann durch die verschiedenen Parameter beispielhaft regenerativ in der Wundheilung

oder toxisch in der Tumorthherapie angewendet werden. Die Anwendung von unterschiedlichen CAP-generierender Geräte zeigt aber auch die Notwendigkeit vieler weiterer Untersuchungen, um gewünschte Effekte und relevante unerwünschte Wirkungen innerhalb der therapeutischen Breite gezielt differenzieren zu können. Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft und den eigenen erhaltenen Ergebnissen könnte CAP als alleinige Therapiealternative in Betracht gezogen werden, wenn keine Notwendigkeit einer mechanischen Keimreduktion zur Absicherung der Wunddesinfektion und -heilung besteht. Um jedoch eine Aussage darüber treffen zu können, ob die gleiche antibakterielle Wirkung unter klinischen Bedingungen realisiert werden kann und dabei die knöcherne Wundheilung signifikant verbessert wird, sind weitere klinische und experimentelle Untersuchungen notwendig. Auch sollte das antibakterielle Potential von CAP auf im Knochen eingebetteten Mikroorganismen getestet werden, an denen wie in realen Infektionen viele Bakterienstämme beteiligt sind.

6 Zusammenfassung

Kaltes physikalisches Plasma ist neben fest, flüssig und gasförmig als vierter Aggregatzustand klassifiziert. Es besitzt die Fähigkeit einen Komplex aus unterschiedlichen Agenzien wie Ionen, elektrische Felder, sichtbares Licht, UV- und Wärmestrahlung sowie reaktive Spezies zu induzieren, welche synergistisch miteinander wirken. Durch sein nachgewiesenes physikalisches und chemisches antibakterielles Potential stellt kaltes Plasma durch seine gute Gewebeverträglichkeit eine innovative und nicht-invasive Therapiealternative in der Medizin und Zahnmedizin dar. Im Gegensatz zu systemisch und lokal applizierten antibakteriellen Wirkstoffen sind bei CAP bisher keine Resistenzentwicklungen nachgewiesen worden. Daher ist CAP imstande, multiresistente Keime effektiv zu reduzieren.

In der vorliegenden Studie wurden jeweils 120 porcine und humane spongiöse Knochenzylinder gewonnen und mit *S. mitis*-Biofilmen beschickt. Hierbei wurden je drei randomisiert selektierte Knochenproben in einem Technovitblock vertikal übereinander positioniert, sodass nur die Oberflächen der obersten Proben exponiert blieben. Es erfolgte die Behandlung mit einem Plasma-Jet (CAPI), Dielectric-Barrier-Discharge-Plasma (CAPII), Chlorhexidin (CHX), photodynamischer Lasertherapie (PDT) oder Natriumchloridlösung als Negativkontrolle (C). Im Anschluss wurden die Bakterien planktonisiert und die Zahl koloniebildender Einheiten (CFU) ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test.

Nach der Applikation von CAPI fand eine signifikante Reduktion der medianen logCFU/ml in der ersten Schicht I bei den porcinen und humanen Knochenproben im Vergleich zur Negativkontrolle statt. Außerdem bewirkte CAPI in der ersten Schicht signifikant reduzierte CFU-Zahlen sowohl im Vergleich zu DBD-Plasma als auch PDT. In Schicht II des porcinen Knochens resultierte die Applikation von CAPI gegenüber CAPII in signifikant kleineren CFU-Zahlen von *S. mitis*. Im porcinen und humanen Knochen in Schicht III war zudem eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen durch CAPI verglichen mit der Negativkontrolle nachweisbar. CAPII bewirkte in keiner Schichttiefe eine signifikante Reduktion der CFU-Zahlen in Relation zu PDT, CHX oder C.

In Abhängigkeit von der verwendeten Plasmaquelle, deren individuell einstellbaren Parametern, des verwendeten Trägergases etc. können unterschiedliche reaktive Wirkkomponenten induziert werden. Beruhend auf aktuellen Studien und den erhobenen Ergebnissen zeigte kaltes Plasma auf unterschiedlichem Gewebe eine antibakterielle Wirkung. Daher könnte Plasma im Hinblick auf die therapeutischen Möglichkeiten die Remission von erkrankten Patienten unterstützen.

Aus der vorliegenden Arbeit ist erkenntlich, dass die antibakterielle Wirksamkeit von der Art der untersuchten Plasmaquelle abhängig ist und insbesondere der kINPen MED Plasma-Jet eine antibakterielle Wirkung auf infiziertem spongiösem porcinen und humanen Knochen bis zu einer Knochenschichttiefe von bis zu 9000 µm besitzt. Auch wenn in keiner der Gruppen eine vollständige Reduktion der koloniebildenden Einheiten auf 0 festzustellen war.

Wissenschaftliche Arbeiten kamen zu dem Resultat, dass von Plasma induzierte Agenzien ebenfalls einen positiven Effekt auf die Vaskularisierung des Knochens sowie die Osteoblastendifferenzierung besitzen kann. Hinsichtlich der Therapie bakteriell assoziierter Knocheninfektionen, wie MRONJ kann die potentielle antibakterielle und knochenheilungsfördernde Wirkung von CAP unterstützend sein. Eine begleitende Applikation von Plasma erscheint anhand der erhobenen Daten vorhandener *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien bei Infektionen des Knochens vielversprechend, auch wenn es aufgrund der limitierten Evidenz weiterer, insbesondere klinischer Studien bedarf.

7 Literaturverzeichnis

1. Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance--problems, progress, and prospects. *N Engl J Med* 2014;371: 1761-3.
2. Spellberg B, Bartlett J, Wunderink R, Gilbert DN. Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191: 135-40.
3. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: A tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis* 2014;59 Suppl 2: S71-5.
4. Daeschlein G, Napp M, Lutze S, Arnold A, von Podewils S, Guembel D, Junger M. Skin and wound decontamination of multidrug-resistant bacteria by cold atmospheric plasma coagulation. *J Dtsch Dermatol Ges* 2015;13: 143-50.
5. Napp M, Daeschlein G, von Podewils S, Hinz P, Emmert S, Haase H, Spitzmueller R, Gumbel D, Kasch R, Junger M. In vitro susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains of staphylococcus aureus to two different cold atmospheric plasma sources. *Infection* 2016;44: 531-7.
6. Katsarelis H, Shah NP, Dhariwal DK, Pazianas M. Infection and medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Dent Res* 2015;94: 534-9.
7. De Antoni CC, Matsumoto MA, Silva AAD, Curi MM, Santiago Junior JF, Sassi LM, Cardoso CL. Medication-related osteonecrosis of the jaw, osteoradionecrosis, and osteomyelitis: A comparative histopathological study. *Braz Oral Res* 2018;32: e23.
8. Anavi-Lev K, Anavi Y, Chaushu G, Alon DM, Gal G, Kaplan I. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws: Clinico-pathological investigation and histomorphometric analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115: 660-6.
9. Panya S, Fliefel R, Probst F, Troltsch M, Ehrenfeld M, Schubert S, Otto S. Role of microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) of actinomyces in medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45: 357-63.
10. Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: Who gets it, and why? *Bone* 2009;44: 4-10.
11. Hinson AM, Smith CW, Siegel ER, Stack BC, Jr. Is bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw an infection? A histological and microbiological ten-year summary. *Int J Dent* 2014;2014: 452737.

12. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63: 1567-75.
13. Poxleitner P, Engelhardt M, Schmelzeisen R, Voss P. The prevention of medication-related osteonecrosis of the jaw. *Dtsch Arztebl Int* 2017;114: 63-69.
14. Krimmel M, Ripperger J, Hairass M, Hoefert S, Kluba S, Reinert S. Does dental and oral health influence the development and course of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (bronj)? *Oral Maxillofac Surg* 2014;18: 213-8.
15. Chan BH, Yee R, Puvanendran R, Ang SB. Medication-related osteonecrosis of the jaw in osteoporotic patients: Prevention and management. *Singapore Med J* 2018;59: 70-75.
16. Abu-Sirhan S, Hertel M, Preissner S, Wirtz HC, Herbst SR, Pierdzioch P, Raguse JD, Hartwig S. Bactericidal efficacy of cold plasma in processed bone. A new approach for adjuvant therapy of medication-related osteonecrosis of the jaw? *Clinical Plasma Medicine* 2016;4: 9-13.
17. Haertel B, von Woedtke T, Weltmann KD, Lindequist U. Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther (Seoul)* 2014;22: 477-90.
18. Castro MG, Araujo CA, Menegaz GL, Silva JP, Nobilo MA, Simamoto Junior PC. Laser and plasma dental soldering techniques applied to ti-6al-4v alloy: Ultimate tensile strength and finite element analysis. *J Prosthet Dent* 2015;113: 460-6.
19. Vargo JJ. Clinical applications of the argon plasma coagulator. *Gastrointest Endosc* 2004;59: 81-8.
20. Lademann J, Richter H, Alborova A, Humme D, Patzelt A, Kramer A, Weltmann KD, Hartmann B, Ottomann C, Fluhr JW, Hinz P, Hubner G, Lademann O. Risk assessment of the application of a plasma jet in dermatology. *J Biomed Opt* 2009;14: 054025.
21. Isbary G, Shimizu T, Li YF, Stolz W, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Rev Med Devices* 2013;10: 367-77.
22. Ballout H, Hertel M, Doebling J, Kostka E, Hartwig S, Paris S, Preissner S. Effects of plasma jet, dielectric barrier discharge, photodynamic therapy and sodium hypochlorite on infected curved root canals. *J Biophotonics* 2018;11.
23. Pierdzioch P, Hartwig S, Herbst SR, Raguse JD, Dommisch H, Abu-Sirhan S, Wirtz HC, Hertel M, Paris S, Preissner S. Cold plasma: A novel approach to treat infected dentin-a combined ex vivo and in vitro study. *Clin Oral Investig* 2016.

24. Wang L, Xia C, Guo Y, Yang C, Cheng C, Zhao J, Yang X, Cao Z. Bactericidal efficacy of cold atmospheric plasma treatment against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol* 2020.
25. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, Gorlitz A, Simon D, Schon MP, Wandke D, Emmert S. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm((r)) vu-2010): Results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (nct01415622). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29: 148-55.
26. Isbary G, Heinlin J, Shimizu T, Zimmermann JL, Morfill G, Schmidt HU, Monetti R, Steffes B, Bunk W, Li Y, Klaempfl T, Karrer S, Landthaler M, Stolz W. Successful and safe use of 2 min cold atmospheric argon plasma in chronic wounds: Results of a randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2012;167: 404-10.
27. Garcia-Alcantara E, Lopez-Callejas R, Morales-Ramirez PR, Pena-Eguiluz R, Fajardo-Munoz R, Mercado-Cabrera A, Barocio SR, Valencia-Alvarado R, Rodriguez-Mendez BG, Munoz-Castro AE, de la Piedad-Beneitez A, Rojas-Olmedo IA. Accelerated mice skin acute wound healing in vivo by combined treatment of argon and helium plasma needle. *Arch Med Res* 2013;44: 169-77.
28. Ma Y, Ha CS, Hwang SW, Lee HJ, Kim GC, Lee KW, Song K. Non-thermal atmospheric pressure plasma preferentially induces apoptosis in p53-mutated cancer cells by activating ROS stress-response pathways. *PLoS One* 2014;9: e91947.
29. Tanaka H, Hori M. Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *J Clin Biochem Nutr* 2017;60: 29-32.
30. Reuter S, Winter J, Iseni S, Peters S, Schmidt-Bleker A, Dünnebier M, Schäfer J, Foest R, Weltmann KD. Detection of ozone in a MHz argon plasma bullet jet. *Plasma Sources Science and Technology* 2012;21: 034015.
31. Winter J, Tresp H, Hammer MU, Iseni S, Kupsch S, Schmidt-Bleker A, Wende K, Dünnebier M, Masur K, Weltmann KD, Reuter S. Tracking plasma generated H₂O₂ from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2014;47: 285401.
32. Reuter S, Winter J, Schmidt-Bleker A, Schroeder D, Lange H, Knake N, Schulz-von der Gathen V, Weltmann KD. Atomic oxygen in a cold argon plasma jet: Talif spectroscopy in ambient air with modelling and measurements of ambient species diffusion. *Plasma Sources Science and Technology* 2012;21: 024005.
33. Joshi SG, Cooper M, Yost A, Paff M, Ercan UK, Fridman G, Friedman G, Fridman A, Brooks AD. Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55: 1053-62.

34. Pipa AV, Reuter S, Foest R, Weltmann KD. Controlling the no production of an atmospheric pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2012;45: 085201.
35. Haertel B, Hahnel M, Blackert S, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Surface molecules on hacat keratinocytes after interaction with non-thermal atmospheric pressure plasma. *Cell Biol Int* 2012;36: 1217-22.
36. Fluhr JW, Sassning S, Lademann O, Darvin ME, Schanzer S, Kramer A, Richter H, Sterry W, Lademann J. In vivo skin treatment with tissue-tolerable plasma influences skin physiology and antioxidant profile in human stratum corneum. *Exp Dermatol* 2012;21: 130-4.
37. Park SB, Kim B, Bae H, Lee H, Lee S, Choi EH, Kim SJ. Differential epigenetic effects of atmospheric cold plasma on mcf-7 and mda-mb-231 breast cancer cells. *PLoS One* 2015;10: e0129931.
38. Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 2004;3: 1109-15.
39. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010;48: 749-62.
40. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ros) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000;5: 415-8.
41. Han L, Patil S, Keener KM, Cullen PJ, Bourke P. Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: Influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA. *J Appl Microbiol* 2014;116: 784-94.
42. Kvam E, Davis B, Mondello F, Garner AL. Nonthermal atmospheric plasma rapidly disinfects multidrug-resistant microbes by inducing cell surface damage. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56: 2028-36.
43. Yamada T, Shimomura Y, Hiraoka Y, Kimbara K. Oxidative stress by biphenyl metabolites induces inhibition of bacterial cell separation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73: 452-7.
44. Arjunan KP, Sharma VK, Ptasińska S. Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review. *Int J Mol Sci* 2015;16: 2971-3016.
45. Han X, Cantrell WA, Escobar EE, Ptasińska S. Plasmid DNA damage induced by helium atmospheric pressure plasma jet. *The European Physical Journal D* 2014;68.
46. Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E, Jarzina F, Brinckmann S, Steinborn E, Havenith M, Benedikt J, Bandow JE. Photons and particles emitted from cold

atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface* 2013;10: 20130591.

47. Alkawareek MY, Gorman SP, Graham WG, Gilmore BF. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43: 154-60.

48. Mai-Prochnow A, Murphy AB, McLean KM, Kong MG, Ostrikov KK. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Agents* 2014;43: 508-17.

49. Fricke K, Koban I, Tresp H, Jablonowski L, Schroder K, Kramer A, Weltmann KD, von Woedtke T, Kocher T. Atmospheric pressure plasma: A high-performance tool for the efficient removal of biofilms. *PLoS One* 2012;7: e42539.

50. Maisch T, Shimizu T, Isbary G, Heinlin J, Karrer S, Klampfl TG, Li YF, Morfill G, Zimmermann JL. Contact-free inactivation of candida albicans biofilms by cold atmospheric air plasma. *Appl Environ Microbiol* 2012;78: 4242-7.

51. Jockenhofer F, Gollnick H, Herberger K, Isbary G, Renner R, Stucker M, Valesky E, Wollina U, Weichenthal M, Karrer S, Klode J, Dissemond J. Bacteriological pathogen spectrum of chronic leg ulcers: Results of a multicenter trial in dermatologic wound care centers differentiated by regions. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013;11: 1057-63.

52. Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, Kolpen M, Line L, Thomsen K, Hoiby N, Jensen PO. Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS* 2017;125: 320-38.

53. Sedghizadeh PP, Sun S, Junka AF, Richard E, Sadrerafi K, Mahabady S, Bakhshalian N, Tjokro N, Bartoszewicz M, Oleksy M, Szymczyk P, Lundy MW, Neighbors JD, Russell RG, McKenna CE, Ebetino FH. Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate-ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms. *J Med Chem* 2017;60: 2326-43.

54. Larsen T, Fiehn NE. Dental biofilm infections - an update. *APMIS* 2017;125: 376-84.

55. Meyer V, Kerk N, Mellmann A, Friedrich A, Luger TA, Goerge T. Mrsa eradication in dermatologic outpatients - theory and practice. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012;10: 186-96.

56. Lowy FD. Antimicrobial resistance: The example of staphylococcus aureus. *J Clin Invest* 2003;111: 1265-73.

57. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2: a000398.

-
58. Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 2005;70: 267-74.
59. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010;64: 357-72.
60. Guo L, Xu R, Gou L, Liu Z, Zhao Y, Liu D, Zhang L, Chen H, Kong MG. Mechanism of virus inactivation by cold atmospheric-pressure plasma and plasma-activated water. *Appl Environ Microbiol* 2018;84.
61. Zimmermann JL, Dumler K, Shimizu T, Morfill GE, Wolf A, Boxhammer V, Schlegel J, Gansbacher B, Anton M. Effects of cold atmospheric plasmas on adenoviruses in solution. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2011;44: 505201.
62. Bunz O, Mese K, Zhang W, Piwowarczyk A, Ehrhardt A. Effect of cold atmospheric plasma (cap) on human adenoviruses is adenovirus type-dependent. *PLoS One* 2018;13: e0202352.
63. Kluge S, Bekeschus S, Bender C, Benkhail H, Sckell A, Below H, Stope MB, Kramer A. Investigating the mutagenicity of a cold argon-plasma jet in an het-mn model. *PLoS One* 2016;11: e0160667.
64. Canal C, Fontelo R, Hamouda I, Guillem-Marti J, Cvelbar U, Ginebra MP. Plasma-induced selectivity in bone cancer cells death. *Free Radic Biol Med* 2017;110: 72-80.
65. Andrisic L, Dudzik D, Barbas C, Milkovic L, Grune T, Zarkovic N. Short overview on metabolomics approach to study pathophysiology of oxidative stress in cancer. *Redox Biol* 2018;14: 47-58.
66. Gumbel D, Suchy B, Wien L, Gelbrich N, Napp M, Kramer A, Ekkernkamp A, Daeschlein G, Stope MB. Comparison of cold atmospheric plasma devices' efficacy on osteosarcoma and fibroblastic in vitro cell models. *Anticancer Res* 2017;37: 5407-14.
67. Mateu-Sanz M, Tornin J, Brulin B, Khlyustova A, Ginebra MP, Layrolle P, Canal C. Cold plasma-treated ringer's saline: A weapon to target osteosarcoma. *Cancers (Basel)* 2020;12.
68. Semmler ML, Bekeschus S, Schafer M, Bernhardt T, Fischer T, Witzke K, Seebauer C, Rebl H, Grambow E, Vollmar B, Nebe JB, Metelmann HR, Woedtke TV, Emmert S, Boeckmann L. Molecular mechanisms of the efficacy of cold atmospheric pressure plasma (cap) in cancer treatment. *Cancers (Basel)* 2020;12.
69. Kim SJ, Chung TH. Cold atmospheric plasma jet-generated ions and their selective effects on normal and carcinoma cells. *Sci Rep* 2016;6: 20332.
70. Ishaq M, Evans MM, Ostrikov KK. Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling. *Int J Cancer* 2014;134: 1517-28.

71. Weiss M, Gumbel D, Gelbrich N, Brandenburg LO, Mandelkow R, Zimmermann U, Ziegler P, Burchardt M, Stope MB. Inhibition of cell growth of the prostate cancer cell model Incap by cold atmospheric plasma. *In Vivo* 2015;29: 611-6.
72. Li W, Yu KN, Ma J, Shen J, Cheng C, Zhou F, Cai Z, Han W. Non-thermal plasma induces mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via ros generation in hela cells. *Arch Biochem Biophys* 2017;633: 68-77.
73. Shi L, Yu L, Zou F, Hu H, Liu K, Lin Z. Gene expression profiling and functional analysis reveals that p53 pathway-related gene expression is highly activated in cancer cells treated by cold atmospheric plasma-activated medium. *PeerJ* 2017;5: e3751.
74. Weiss M, Gumbel D, Hanschmann EM, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, Walther R, Ekkernkamp A, Sckell A, Kramer A, Burchardt M, Lillig CH, Stope MB. Cold atmospheric plasma treatment induces anti-proliferative effects in prostate cancer cells by redox and apoptotic signaling pathways. *PLoS One* 2015;10: e0130350.
75. Koensgen D, Besic I, Gumbel D, Kaul A, Weiss M, Diesing K, Kramer A, Bekeschus S, Mustea A, Stope MB. Cold atmospheric plasma (cap) and cap-stimulated cell culture media suppress ovarian cancer cell growth - a putative treatment option in ovarian cancer therapy. *Anticancer Res* 2017;37: 6739-44.
76. Arndt S, Wacker E, Li YF, Shimizu T, Thomas HM, Morfill GE, Karrer S, Zimmermann JL, Bosserhoff AK. Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells. *Exp Dermatol* 2013;22: 284-9.
77. Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of pseudomonas aeruginosa strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC Infect Dis* 2016;16 Suppl 1: 92.
78. Hartwig S, Preissner S, Voss JO, Hertel M, Doll C, Waluga R, Raguse JD. The feasibility of cold atmospheric plasma in the treatment of complicated wounds in cranio-maxillo-facial surgery. *J Craniomaxillofac Surg* 2017;45: 1724-30.
79. Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY, Yurov DS, Vasiliev MM, Kaminskaya AA, Moisenovich MM, Romanova JM, Murashev AN, Selezneva, II, Shimizu T, Sysolyatina EV, Shaginyan IA, Petrov OF, Mayevsky EI, Fortov VE, Morfill GE, Naroditsky BS, Gintsburg AL. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J Med Microbiol* 2011;60: 75-83.
80. Tamari T, Elimelech R, Cohen G, Cohen T, Doppelt O, Eskander-Hashoul L, Zigdon-Giladi H. Endothelial progenitor cells inhibit jaw osteonecrosis in a rat model: A major adverse effect of bisphosphonate therapy. *Sci Rep* 2019;9: 18896.
81. Cui HS, Joo SY, Lee DH, Yu JH, Jeong JH, Kim JB, Seo CH. Low temperature plasma induces angiogenic growth factor via up-regulating hypoxia-inducible factor 1alpha in human dermal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 2017;630: 9-17.

82. Tominami K, Kanetaka H, Sasaki S, Mokudai T, Kaneko T, Niwano Y. Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation. *PLoS One* 2017;12: e0180507.
83. <differential viability of eight human blood mononuclear cell subpopulations after plasma treatment.Pdf>.
84. Haertel B, Volkmann F, von Woedtke T, Lindequist U. Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric-pressure plasma. *Immunobiology* 2012;217: 628-33.
85. Steinbeck MJ, Chernets N, Zhang J, Kurpad DS, Fridman G, Fridman A, Freeman TA. Skeletal cell differentiation is enhanced by atmospheric dielectric barrier discharge plasma treatment. *PLoS One* 2013;8: e82143.
86. Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* 2010;38: 748-57.
87. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Karrer S. Cold atmospheric plasma (cap) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013;8: e79325.
88. Arndt S, Unger P, Berneburg M, Bosserhoff AK, Karrer S. Cold atmospheric plasma (cap) activates angiogenesis-related molecules in skin keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells and improves wound angiogenesis in an autocrine and paracrine mode. *J Dermatol Sci* 2017.
89. Eggers B, Marciniak J, Memmert S, Kramer FJ, Deschner J, Nokhbehsaim M. The beneficial effect of cold atmospheric plasma on parameters of molecules and cell function involved in wound healing in human osteoblast-like cells in vitro. *Odontology* 2020.
90. Arjunan KP, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species. *J R Soc Interface* 2012;9: 147-57.
91. Arndt S, Landthaler M, Zimmermann JL, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Li YF, Morfill GE, Bosserhoff AK, Karrer S. Effects of cold atmospheric plasma (cap) on ss-defensins, inflammatory cytokines, and apoptosis-related molecules in keratinocytes in vitro and in vivo. *PLoS One* 2015;10: e0120041.
92. Mitchell J. Streptococcus mitis: Walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol* 2011;26: 89-98.
93. Seo HS, Xiong YQ, Mitchell J, Seepersaud R, Bayer AS, Sullam PM. Bacteriophage lysin mediates the binding of streptococcus mitis to human platelets through interaction with fibrinogen. *PLoS Pathog* 2010;6: e1001047.

94. Becker S, Zimmermann JL, Baumeister P, Brunner TF, Shimizu T, Li YF, Morfill GE, Harreus U, Welz C. Effects of cold atmospheric plasma (cap) on bacteria and mucosa of the upper aerodigestive tract. *Auris Nasus Larynx* 2018.
95. Lackmann JW, Bandow JE. Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98: 6205-13.
96. Dubuc A, Monsarrat P, Virard F, Merbahi N, Sarrette JP, Laurencin-Dalichieux S, Cousty S. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: A concise systematic review. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10: 1758835918786475.
97. Herbst SR, Hertel M, Ballout H, Pierdzioch P, Weltmann KD, Wirtz HC, Abu-Sirhan S, Kostka E, Paris S, Preissner S. Bactericidal efficacy of cold plasma at different depths of infected root canals in vitro. *Open Dent J* 2015;9: 486-91.
98. Pan J, Sun K, Liang Y, Sun P, Yang X, Wang J, Zhang J, Zhu W, Fang J, Becker KH. Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro. *J Endod* 2013;39: 105-10.
99. Mai-Prochnow A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. Gram positive and gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep* 2016;6: 38610.
100. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: A review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 2001;226: 1-21.
101. S. Schneider J-WL, F. Narberhaus, J. E. Bandow, B. Denis, and J. Benedikt. Separation of vuv:Uv photons and reactive particles in the effluent of a he:O₂ atmospheric pressure plasma jet. *Journal of Physics D: Applied Physics* 2011.
102. Wu AS, Kalghatgi S, Dobrynin D, Sensenig R, Cerchar E, Podolsky E, Dulaimi E, Paff M, Wasko K, Arjunan KP, Garcia K, Fridman G, Balasubramanian M, Ownbey R, Barbee KA, Fridman A, Friedman G, Joshi SG, Brooks AD. Porcine intact and wounded skin responses to atmospheric nonthermal plasma. *J Surg Res* 2013;179: e1-e12.
103. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: Have we moved forward? *Biochem J* 2007;401: 1-11.
104. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11: 85-95.
105. Wang LY, Huang ZL, Li G, Zhao HX, Xing XH, Sun WT, Li HP, Gou ZX, Bao CY. Novel mutation breeding method for streptomyces avermitilis using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *J Appl Microbiol* 2010;108: 851-8.
106. Ramsey MR, Sharpless NE. Ros as a tumour suppressor? *Nat Cell Biol* 2006;8: 1213-5.

107. Wende K, Strassenburg S, Haertel B, Harms M, Holtz S, Barton A, Masur K, von Woedtke T, Lindequist U. Atmospheric pressure plasma jet treatment evokes transient oxidative stress in hacat keratinocytes and influences cell physiology. *Cell Biol Int* 2014;38: 412-25.
108. Schmidt A, Woedtke TV, Stenzel J, Lindner T, Polei S, Vollmar B, Bekeschus S. One year follow-up risk assessment in skh-1 mice and wounds treated with an argon plasma jet. *Int J Mol Sci* 2017;18.
109. Haertel B, Strassenburg S, Oehmigen K, Wende K, von Woedtke T, Lindequist U. Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human hacat keratinocytes. *Biomed Res Int* 2013;2013: 761451.
110. Allegra A, Alonci A, Penna G, Granata A, Nastro Siniscalchi E, Oteri G, Loddo S, Teti D, Cicciu D, De Ponte FS, Musolino C. Bisphosphonates induce apoptosis of circulating endothelial cells in multiple myeloma patients and in subjects with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Acta Haematol* 2010;124: 79-85.
111. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone* 2016;91: 30-8.
112. Preissner S, Wirtz HC, Tietz AK, Abu-Sirhan S, Herbst SR, Hartwig S, Pierdzioch P, Schmidt-Westhausen AM, Dommisch H, Hertel M. Bactericidal efficacy of tissue tolerable plasma on microrough titanium dental implants: An in-vitro-study. *J Biophotonics* 2016;9: 637-44.
113. Byung Gyu Kim S-JS, Jung-Hwan Lee and Hae-Won Kim On-site surface functionalization for titanium dental implant with nanotopography: Review and outlook. *Journal of Nanomaterials* 2016;Volume 2016.
114. Yang Y, Zheng M, Yang Y, Li J, Su YF, Li HP, Tan JG. Inhibition of bacterial growth on zirconia abutment with a helium cold atmospheric plasma jet treatment. *Clin Oral Investig* 2020.
115. Yang Y, Guo J, Zhou X, Liu Z, Wang C, Wang K, Zhang J, Wang Z. A novel cold atmospheric pressure air plasma jet for peri-implantitis treatment: An in vitro study. *Dent Mater J* 2018;37: 157-66.
116. Idlibi AN, Al-Marrawi F, Hannig M, Lehmann A, Rueppell A, Schindler A, Jentsch H, Rupf S. Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (ti) surfaces by cold atmospheric plasma. *Biofouling* 2013;29: 369-79.
117. Hope CK, Wilson M. Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48: 1461-8.

118. Shen Y, Zhao J, de la Fuente-Nunez C, Wang Z, Hancock RE, Roberts CR, Ma J, Li J, Haapasalo M, Wang Q. Experimental and theoretical investigation of multispecies oral biofilm resistance to chlorhexidine treatment. *Sci Rep* 2016;6: 27537.
119. Kofler B, Romani A, Pritz C, Steinbichler TB, Schartinger VH, Riechelmann H, Dudas J. Photodynamic effect of methylene blue and low level laser radiation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Mol Sci* 2018;19.
120. Plotino G, Grande NM, Mercade M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int Endod J* 2018.

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Wei-Long Dennis Chen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die antibakterielle Wirksamkeit kalter atmosphärischer Plasmen in Knochen. Eine *In-vitro*-Studie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

|

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Danksagung

Für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit und die Bereitstellung des Themas möchte ich mich aufrichtig bei Herrn PD. Dr. Moritz Hertel und Frau PD. Dr. Saskia Preissner bedanken. Durch eure hilfreichen Anregungen und kollegialen Hinweise, fühlte ich mich stets in guten Händen.

Ebenso danke ich Dr. med. Dr. dent. med. Stefan Hartwig.

Sowie meinen lieben Kollegen und Kolleginnen und MTA's der Charité Universitätsmedizin Berlin, die mir bei der aufwendigen Datenerfassung und Durchführung der Versuche geholfen haben und zur Seite standen.

Auch möchte ich mich bei meinen Freunden für die Ermutigungen und den gemeinsamen Kampfgeist bedanken.

Insbesondere gilt der Dank meiner Familie, die mich während meiner akademischen Laufbahn und darüber hinaus mein Leben lang unterstützten und lehrten. Der Einfluss jedes Einzelnen machte mich zum dem was ich heute bin und erreicht habe.